

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005918

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-106268
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 6 2 6 8

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 0 6 2 6 8

出 願 人
Applicant(s): 第一製薬株式会社
財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	NP03-1119
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	A61K 38/17 C12N 15/09
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番7号 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内
【氏名】	小原 収
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番7号 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内
【氏名】	長瀬 隆弘
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番7号 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内
【氏名】	大石 道夫
【発明者】	
【住所又は居所】	栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋5 1 9 第一製薬株式会社 栃木研究センター内
【氏名】	横田 博
【発明者】	
【住所又は居所】	栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋5 1 9 第一製薬株式会社 栃木研究センター内
【氏名】	柴田 修
【特許出願人】	
【識別番号】	000002831
【氏名又は名称】	第一製薬株式会社
【特許出願人】	
【識別番号】	599113914
【氏名又は名称】	財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
【代理人】	
【識別番号】	100088904
【弁理士】	
【氏名又は名称】	庄司 隆
【電話番号】	03-3864-6572
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	067070
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列表の配列番号 3 若しくは 5 に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 4 若しくは 6 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド。

【請求項 3】

配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドであって、C d c 4 2 の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドの塩基配列と少なくとも約 70 % の相同性を有する塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであって、C d c 4 2 の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドの塩基配列において、1 乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリヌクレオチドであって、C d c 4 2 の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドであって、C d c 4 2 の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の組換えベクターおよび C d c 4 2 をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体。

【請求項 10】

配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質。

【請求項 11】

配列表の配列番号 4 または 6 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質。

【請求項 12】

請求項 3 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドがコードする蛋白質。

【請求項 13】

請求項 8 または 9 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項 14】

請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を認識する抗体。

【請求項 15】

請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の機能および／または請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、

該化合物と該蛋白質および／または該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該機能および／または該発現の存在、不存在または変化を検出することにより、該化合物が該蛋白質の機能および／または該ポリヌクレオチドの発現を阻害するか否かを判定することを特徴とする同定方法。

【請求項 16】

蛋白質の機能が、C d c 4 2 と結合する機能および／または C d c 4 2 の活性化を促進する機能である請求項 15 に記載の同定方法。

【請求項 17】

請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の機能および／または請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求項 7 に記載の組換えベクター、請求項 8 または 9 に記載の形質転換体および請求項 14 に記載の抗体のうち少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とする同定方法。

【請求項 18】

蛋白質の機能が、C d c 4 2 と結合する機能および／または C d c 4 2 の活性化を促進する機能である請求項 17 に記載の同定方法。

【請求項 19】

ヒト胃組織由来の被検組織が、ヒト胃腫瘍由来組織であるか否かを判定する方法であって、該被検組織における請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現量を測定することを特徴とする判定方法。

【請求項 20】

被検組織における請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現量が、対照であるヒト正常胃由来組織における該ポリヌクレオチドの発現量の 4.5 倍以上である場合に、被検組織がヒト胃腫瘍由来組織であると判定することを特徴とする、請求項 19 に記載の判定方法。

【請求項 21】

請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の機能を阻害する化合物および／または請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を有効成分として含んでなる胃腫瘍の防止剤および／または治療剤。

【請求項 22】

請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の機能を阻害する化合物および／または請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を用いることを特徴とする胃腫瘍の防止方法および／または治療方法。

【請求項 23】

請求項 10 から 12 のいずれか 1 項に記載の蛋白質、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求項 7 に記載の組換えベクター、請求項 8 または 9 に記載の形質転換体および請求項 14 に記載の抗体のうち少なくともいずれか 1 つを含んでなる試薬キット。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グアニンヌクレオチド交換因子をコードする遺伝子およびその遺伝子産物

【技術分野】

【0001】

本発明は、低分子量GTP結合蛋白質の1グループであるRhoファミリー蛋白質に対してグアニンヌクレオチド交換因子として作用する蛋白質および該蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。より詳しくは、Rhoファミリー低分子量GTP結合蛋白質であるCdc42と結合する蛋白質、該蛋白質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体に関する。また、前記蛋白質の製造方法、前記蛋白質に対する抗体に関する。さらに、前記蛋白質の機能および／または前記ポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法に関する。また、前記ポリヌクレオチドの発現量を測定することを特徴とする胃腫瘍の診断方法に関する。さらに、前記蛋白質の機能阻害剤および／または前記ポリヌクレオチドの発現阻害剤を有効成分として含んでなる胃腫瘍の防止剤および／または治療剤、前記蛋白質の機能阻害剤および／または前記ポリヌクレオチドの発現阻害剤を用いることを特徴とする、胃腫瘍の防止方法および／または治療方法に関する。また、前記蛋白質、前記ポリヌクレオチド、前記組換えベクター、前記形質転換体および前記抗体のうち、少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

Rhoファミリー低分子量GTP結合蛋白質（以下、単にRhoファミリー蛋白質と称することがある）は低分子量GTP結合蛋白質（以下、単に低分子量G蛋白質と称する）の1グループに属する蛋白質である。低分子量G蛋白質は、細胞膜受容体と細胞内情報伝達経路に参与する効果器（エフェクター）との間で、シグナルの増幅因子として作用する。また、低分子量G蛋白質は、グアノシン5'-三リン酸（GTP）またはグアノシン5'-二リン酸（GDP）と特異的に結合し、結合したGTPをGDPに加水分解する酵素活性をもつ。細胞膜受容体に細胞外情報物質が結合すると、そのシグナルが低分子量G蛋白質に伝達され、低分子量G蛋白質に結合しているGDPと細胞内に存在するGTPとの交換反応（以下、GDP/GTP交換反応と略称する）が起きる。その結果、活性型のGTP結合型低分子量G蛋白質が生じる。活性型低分子量G蛋白質は、エフェクターに作用してシグナルを増幅する。その後、GTP結合型低分子量G蛋白質は、結合しているGTPをその酵素活性によりGDPに加水分解することにより不活性化する。このように、低分子量G蛋白質は、グアニンヌクレオチドの交換により、細胞内情報伝達経路において分子スイッチとして働く。

【0003】

Rhoファミリー蛋白質としては、Cdc42、Rac1およびRhoA等が知られている。Cdc42は線維芽細胞でフィロポディアの形成を制御している。Rac1は、白血球やマクロファージではスーパーオキシドの産生を、線維芽細胞では細胞膜のラフリングやラメリポディアの形成をそれぞれ制御している。また、Cdc42とRac1はc-Jun N末端キナーゼシグナル伝達経路を活性化することもできる。このように、Rhoファミリー蛋白質は、細胞内情報伝達の制御を介して様々な細胞機能に参与している。Rhoファミリー蛋白質が関与する細胞機能として、例えば細胞骨格の再構成、細胞接着、遺伝子発現等が知られている。Rhoファミリー蛋白質を介するこのような作用は、発生時の形態形成、白血球等の遊走、神経突起退縮、および癌細胞の転移や浸潤に働くと考えられる。

【0004】

Rhoファミリー蛋白質の分子スイッチとしての作用に関与している分子の1つがRhoグアニンヌクレオチド交換因子（Rho Guanine nucleotide Exchange Factor、以下Rho-GEFと略称する）である。Rho-GEFは、Rhoファミリー蛋白質のGDP/GTP交換反応を促進して、Rhoファミリー

蛋白質の活性化を促進する機能を有する。この機能により、R h o - G E F は、R h o ファミリー蛋白質が関与する細胞内情報伝達の制御に重要な役割を担う。以下、G D P / G T P 交換反応を促進する機能を G E F 活性と称することもある。

【0005】

R h o - G E F には、特徴的ドメイン構造、例えば D b l 相同ドメイン (D b l H o m o l o g y D o m a i n、以下 D H ドメインと略称する。) およびプレックストリン相同ドメイン (P l e c k s t r i n H o m o l o g y D o m a i n、以下 P H ドメインと略称する。) が存在する。D H / P H のタンデム構造は、R h o - G E F に典型的なドメイン構造である。以下、D H ドメインおよび P H ドメインのタンデム構造を、D H / P H ドメインと呼称する。

【0006】

D H / P H ドメインは、R h o - G E F による R h o ファミリー蛋白質の活性化に寄与する重要なドメインであり、R h o - G E F の活性ドメインであると考えられている。例えば、R h o - G E F のプロトタイプである p r o t o - D b l のアミノ酸配列のうち、D H / P H ドメインを含む C 末端側領域からなる蛋白質が、R h o ファミリー蛋白質を活性化することが報告されている (非特許文献 1)。この報告において、p r o t o - D b l の全長 925 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列のうち N 末端側第 1 番目から第 497 番目のアミノ酸残基の欠失により生じた C 末端側領域からなる蛋白質は、R h o ファミリー蛋白質を活性化し、その結果、細胞形質転換に関与した。このことから、p r o t o - D b l の活性化は腫瘍原性活性化 (o n c o g e n i c a c t i v a t i o n) と考えられている。以下、p r o t o - D b l の C 末端側領域からなるこのような蛋白質を o n c o g e n i c - D b l と呼称する。o n c o g e n i c - D b l が、R h o A、C d c 42 および R a c 1 と結合すること、および C d c 42 および R h o A に対して G E F 活性を有する一方、R a c 1 には G E F 活性を示さないことが報告されている (非特許文献 2)。

【0007】

p r o t o - D b l のファミリー蛋白質をコードする遺伝子として、例えば v a v (非特許文献 3 および 4)、o s t (非特許文献 5)、l b c (非特許文献 6) 等が知られている。これら遺伝子は癌に関与する遺伝子である。その他、R h o - G E F として作用する蛋白質をコードする遺伝子として、T r i o (非特許文献 7) や k a l i r i n (非特許文献 8) 等が報告されている。T r i o は、そのノックアウトマウスにおいて胎仔発生時の骨格筋の異常および脳の構成異常を引き起こす。k a l i r i n は、神経細胞における神経突起形成に関与する。このように、R h o - G E F として作用する蛋白質が関与する細胞機能は各蛋白質ごとに固有であり、また、該蛋白質が活性化する R h o ファミリー蛋白質もそれぞれ異なる。

【0008】

以下に本明細書において引用した文献を列記する。

【非特許文献 1】ビ (B i , F .) ら、「モレキュラー アンド セルラー バイオロジー (M o l e c u l a r a n d C e l l u l a r B i o l o g y) 」、2001 年、第 21 巻、p. 1463-1474。

【非特許文献 2】ハート (H a r t , M . J .) ら、「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y) 」、1994 年、第 269 巻、p. 62-65。

【非特許文献 3】カツァブ (K a t z a v , S .) ら、「エンボ ジャーナル (E M B O J o u r n a l) 」、1989 年、第 8 巻、p. 2283-2290。

【非特許文献 4】コステロ (C o s t e l l o , P . S .) ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (P r o c e e d i n g s o f T h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s o f T h e U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a) 」、1999 年、第 96 巻、p. 303

5-3040。

【非特許文献5】ホリイ (Hori i, Y.) ら「エンボ ジャーナル (EMBO Journal)」、1994年、第13巻、p. 4776-4786

【非特許文献6】トクソズ (Toksoz, D.) ら、「オンコジーン (Oncogene)」、1994年、第9巻、p. 621-628。

【非特許文献7】オブリエン (O'Brien, S. P.) ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、2000年、第97巻、p. 12074-12078。

【非特許文献8】ペンゼス (Penzes, P.) ら、「ジャーナル オブ ニューロサイエンス (Journal of Neuroscience)」、2001年、第21巻、p. 8426-8434。

【非特許文献9】サンプブック (Sambrook) ら編、「モレキュラークローニング, ア ラボラトリーマニュアル 第2版」、1989年、コールドスプリングハーバーラボラトリー。

【非特許文献10】村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、1988年、丸善株式会社。

【非特許文献11】マディン (Madin, K.) ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、2000年、第97巻、p. 559-564。

【非特許文献12】ウルマー (Ulmer, K. M.)、「サイエンス (Science)」、1983年、第219巻、p. 666-671。

【非特許文献13】エールリッヒ (Ehrlich, H. A.) 編、「PCRテクノロジー, DNA増幅の原理と応用」、1989年、ストックトンプレス。

【非特許文献14】サイキ (Saiki, R. K.) ら、「サイエンス (Science)」、1985年、第230巻、p. 1350-1354。

【非特許文献15】「実験医学」、1994年、第12巻、第6号、p. 35-。

【非特許文献16】フローマン (Frohman, M. A.) ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、1988年、第85巻、第23号、p. 8998-9002。

【非特許文献17】「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、1977年、第74巻、p. 5463-5467。

【非特許文献18】「メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)」、1980年、第65巻、p. 499-560。

【非特許文献19】オハラ (Ohara, O.) ら、「ディーエヌエー リサーチ (DNA Research)」、1997年、第4巻、p. 53-59。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、新規な R h o - G E F および該 R h o - G E F をコードする遺伝子を提供することである。また本発明の課題には、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体を提供することも含まれる。さらに本発明の課題には、該 R h o - G E F の製造方法および該 R h o - G E F を認識する抗体を提供することも含まれる。また本発明の課題には、該 R h o - G E F の機能および／または該遺伝子の発現を阻害する化合物の同定方法を提供することも含まれる。さらに本発明の課題には、該 R h o - G E F の機能の異常および／または該遺伝子の発現の異常に基づく疾患の防止方法および／または治療方法、並びに該疾患の診断方法、試薬キットを提供することも含まれる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは上記課題解決のために鋭意努力し、新規 R h o - G E F をコードする遺伝子を見出し、該遺伝子を用いて新規 R h o - G E F を取得することに成功した。そして、該 R h o - G E F の D H / P H ドメインを含む部分蛋白質が、R h o ファミリー蛋白質である R h o A、C d c 4 2 および R a c 1 とそれぞれ結合することを実験的に明らかにした。また、該蛋白質が C d c 4 2 の活性化を促進することを実験的に明らかにした。さらに該 R h o - G E F 遺伝子の組織発現が、ある胃腺癌様腫瘍 (A d e n o c a r c i n o i d t u m o r) 例において正常な胃組織の約 5 倍、4 . 5 倍以上であることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて達成した。

【0011】

すなわち、本発明は、

1. 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、
2. 配列表の配列番号 3 若しくは 5 に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 4 若しくは 6 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、
3. 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、または配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、C d c 4 2 の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、
4. 前記 1. または 2. のポリヌクレオチドの塩基配列と少なくとも約 70 % の同一性を有する塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであって、C d c 4 2 の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、
5. 前記 1. または 2. のポリヌクレオチドの塩基配列において、1 乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリヌクレオチドであって、C d c 4 2 の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、
6. 前記 1. または 2. のポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドであって、C d c 4 2 の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、
7. 前記 1. から 6. のいずれかのポリヌクレオチドを含む組換えベクター、
8. 前記 7. の組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体、
9. 前記 7. の組換えベクターおよび C d c 4 2 をコードするポリヌクレオチドを含む組換えベクターにより形質転換されてなる形質転換体、
10. 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質、
11. 配列表の配列番号 4 または 6 に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質、
12. 前記 3. から 6. のいずれかのポリヌクレオチドがコードする蛋白質、

13. 前記8. または9. の形質転換体を培養する工程を含む、前記10. から12. のいずれかの蛋白質の製造方法、

14. 前記10. から12. のいずれかの蛋白質を認識する抗体、

15. 前記10. から12. のいずれかの蛋白質の機能および／または前記1. から6. のいずれかのポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、該化合物と該蛋白質および／または該ポリヌクレオチドとの相互作用を可能にする条件下で、該機能および／または該発現の存在、不存在または変化を検出することにより、該化合物が該蛋白質の機能および／または該ポリヌクレオチドの発現を阻害するか否かを判定することを特徴とする同定方法、

16. 蛋白質の機能が、C d c 4 2 と結合する機能および／またはC d c 4 2 の活性化を促進する機能である前記15. の同定方法、

17. 前記10. から12. のいずれかの蛋白質の機能および／または前記1. から6. のいずれかのポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法であって、前記10. から12. のいずれかの蛋白質、前記1. から6. のいずれかのポリヌクレオチド、前記7. の組換えベクター、前記8. または9. の形質転換体および前記14. の抗体のうち少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする同定方法、

18. 蛋白質の機能が、C d c 4 2 と結合する機能および／またはC d c 4 2 の活性化を促進する機能である前記17. の同定方法、

19. ヒト胃組織由来の被検組織が、ヒト胃腫瘍由来組織であるか否かを判定する方法であって、該被検組織における前記1. から6. のいずれかのポリヌクレオチドの発現量を測定することを特徴とする判定方法、

20. 被検組織における前記1. から6. のいずれかのポリヌクレオチドの発現量が、対照であるヒト正常胃由来組織における該ポリヌクレオチドの発現量の4. 5倍以上である場合に、被検組織がヒト胃腫瘍由来組織であると判定することを特徴とする、前記19. の判定方法、

21. 前記10. から12. のいずれかの蛋白質の機能を阻害する化合物および／または前記1. から6. のいずれかのポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を有効成分として含んでなる胃腫瘍の防止剤および／または治療剤、

22. 前記10. から12. のいずれかの蛋白質の機能を阻害する化合物および／または前記1. から6. のいずれかのポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物を用いることを特徴とする胃腫瘍の防止方法および／または治療方法、

23. 前記10. から12. のいずれかの蛋白質、前記1. から6. のいずれかのポリヌクレオチド、前記7. の組換えベクター、前記8. または9. の形質転換体および前記14. の抗体のうち少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット、

からなる

【発明の効果】

【0012】

本発明においては、R h oファミリー蛋白質に結合する機能を有し、G D P／G T P交換反応を促進してR h oファミリー蛋白質を活性化し得る新規蛋白質および該蛋白質をコードするポリヌクレオチドを提供可能である。本蛋白質は、R h oファミリー蛋白質であるR h o A、C d c 4 2およびR a c 1とそれぞれ結合する。さらに本蛋白質は、C d c 4 2の活性化を促進する。本蛋白質およびポリヌクレオチドにより、R h oファミリー蛋白質が関与する情報伝達経路および細胞機能の解明とその調節が可能になる。さらに、本蛋白質の機能の異常および／または本ポリヌクレオチド発現の異常に基づく疾患、例えば胃腫瘍の診断、防止および／または治療が可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。

本明細書においては、単離された完全長D N Aおよび／またはR N A；合成完全長D N Aおよび／またはR N A；単離されたD N Aオリゴヌクレオチド類および／またはR N A

オリゴヌクレオチド類；あるいは合成DNAオリゴヌクレオチド類および／またはRNAオリゴヌクレオチド類を意味する総称的用語として「ポリヌクレオチド」という用語を使用し、ここでそのようなDNAおよび／またはRNAは最小サイズが2ヌクレオチドである。

本明細書においては、単離された若しくは合成の完全長蛋白質；単離された若しくは合成の完全長ポリペプチド；または単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドを意味する総称的用語として「蛋白質」という用語を使用し、ここで蛋白質、ポリペプチド若しくはオリゴペプチドは最小サイズが2アミノ酸である。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字または3文字にて表記することがある。

【0014】

(ポリヌクレオチド)

本発明の一態様は新規ポリヌクレオチドに関する。本ポリヌクレオチドは、ヒト脳由来長鎖cDNAライブラリーから、Rho-GEFに特徴的なドメインであるDH/PHドメインをコードする領域を有する遺伝子として同定した。ヒト脳由来長鎖cDNAライブラリーは、市販のヒト脳、胎児脳および脳海馬由来のpolyA⁺RNAを出発原料として常法により構築したcDNAライブラリーについてdbEST(database of Expressed Sequence Tags)分析によりcDNA断片を単離して塩基配列を決定したcDNAクローンからなるcDNAライブラリーである。

【0015】

本発明に係るポリヌクレオチドの具体的態様は、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであり得る。配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、4977bpのポリヌクレオチドであり、1340アミノ酸残基(配列番号2)をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。配列番号1に記載の塩基配列において第602番目から第1126番目までのヌクレオチドからなる領域は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の第97番目のバリン(Val)から第271番目のアスパラギン酸(Asp)までの175アミノ酸残基からなるDHドメインをコードする。配列番号1に記載の塩基配列において第1202番目から第1495番目までのヌクレオチドからなる領域は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の第297番目のロイシン(Leu)から第394番目のロイシン(Leu)までの98アミノ酸残基からなるPHドメインをコードする。配列番号1に記載の塩基配列において第602番目から第1495番目までのヌクレオチドからなる領域は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の第97番目のバリン(Val)から第394番目のロイシン(Leu)までの298アミノ酸残基からなるDH/PHドメインをコードする。本発明の範囲には、配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドも包含される。

【0016】

本発明に係るポリヌクレオチドとしてまた、配列番号3若しくは5に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドが例示できる。配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、配列番号1に記載の塩基配列の第581番目から第1675番目までの塩基配列で表わされるポリヌクレオチドである。また、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの5'末端にコザックコンセンサス配列(以下、コザックシーケンスと略称する)とメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)が付加されたポリヌクレオチドである。配列番号3または5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、Rho-GEFの活性ドメインであるDH/PHドメインをコードする領域を含む。

【0017】

本発明に係るポリヌクレオチドは、好ましくは、Rhoファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相

補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドである。かかるポリヌクレオチドとして、配列番号5に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを好ましく例示できる。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドとR h oファミリー蛋白質をコードする遺伝子とを共に発現させた動物細胞において、R h oファミリー蛋白質の活性化が促進された（実施例4参照）。すなわち、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進すると考える。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、配列番号1に記載の塩基配列の第581番目から第1675番目までの塩基配列で表わされるポリヌクレオチド（配列番号3）の5'末端にコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド（配列番号19）が付加されたポリヌクレオチド（配列番号5）である。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質のN末端にメチオニンがペプチド結合により付加された蛋白質である。コザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド（配列番号19）は、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの発現を目的として付加したオリゴヌクレオチドであり、発現された蛋白質の機能に大きな影響を与えない。したがって、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドは、コザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド（配列番号19）が付加されていないが、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考える。

【0018】

配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質および配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質はいずれも、上記のように、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する。配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質として配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質が挙げられる。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質として配列番号6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質が挙げられる。配列番号4若しくは6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドも本発明の範囲に包含される。

【0019】

配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考えられることから、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドも、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考える。また、配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドも、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考える。配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドとして例えば、配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドも、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードすると考える。

【0020】

本発明の範囲には、配列番号3に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドまたは配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドも包含される。好ましくは、このようなポリヌクレオチドであって、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドである。さらに好ましくは、該ポリヌクレオチドであって、DH／PHドメインコード領域を有するポリヌクレオチドである。

【0021】

本発明に係るポリヌクレオチドがコードする蛋白質が活性化を促進するR h oファミリー蛋白質としては、例えばC d c 4 2、R h o AおよびR a c 1等、より好ましくはC d c 4 2が例示できる。R h oファミリー蛋白質はこれらに限定されず、本ポリヌクレオチドがコードする蛋白質が活性化を促進する限りにおいていずれのR h oファミリー蛋白質であってもよい。本ポリヌクレオチドがコードする蛋白質の、R h oファミリー蛋白質の活性化に対する促進機能は、例えばエフェクタープルダウン法を使用して測定できる（実施例4参照）。

【0022】

C d c 4 2、R h o AおよびR a c 1は、それぞれ配列表の配列番号21、23および25に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質である。C d c 4 2遺伝子、R h o A遺伝子およびR a c 1遺伝子は、それぞれ配列表の配列番号20、22および24に記載の塩基配列で表わされる遺伝子である。C d c 4 2、R h o AおよびR a c 1並びにこれらの遺伝子は、上記各配列で表わされるものに限らず、一般的に知られているC d c 4 2、R h o AおよびR a c 1の機能を有する限りにおいて、上記各配列において1乃至数個の変異を有する蛋白質および遺伝子であることができる。また、これらの機能を促進するあるいは欠失させるといった所望の目的のために上記各配列に1乃至数個の変異を導入した変異体を用いることもできる。例えば、C d c 4 2、R h o AおよびR a c 1は、それぞれの遺伝子を含有する組換えベクターを自体公知の遺伝子工学的方法により導入してなる形質転換体を培養すること等により、取得することが可能である。

【0023】

本発明に係るポリヌクレオチドは、本発明により開示されたその具体例、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドについての配列情報に基づいて、公知の遺伝子工学的手法（非特許文献9および10等を参照）により容易に取得することができる。

【0024】

具体的には、本発明に係るポリヌクレオチドの発現が確認されている適当な起源から、常法に従ってc D N Aライブラリーを調製し、該c D N Aライブラリーから所望のクローンを選択することにより本ポリヌクレオチドを取得可能である。c D N Aの起源としては、本ポリヌクレオチドの発現が確認されている各種の細胞や組織、またはこれらに由来する培養細胞、例えばヒトの脳由来の細胞等が例示できる。これら起源からの全R N Aの分離、m R N Aの分離や精製、c D N Aの取得とそのクローニング等はいずれも常法に従って実施可能である。また、ヒトの脳、胎児脳および脳海馬由来の市販されているp o l y A⁺ R N Aからc D N Aライブラリーを構築して用いることもできる。c D N Aライブラリーから所望のクローンを選択する方法も特に制限されず、慣用の方法を利用できる。例えば、本ポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイゼーションするプローブやプライマー等を用いて所望のクローンを選択することができる。具体的には、本ポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイゼーションするプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法等やこれらを組合せた方法等を例示できる。ここで用いるプローブとしては、本ポリヌクレオチドの配列情報に基づいて化学合成したポリヌクレオチド等が一般的に使用できるが、既に取得された本ポリヌクレオチドやその部分塩基配列で表わされるポリヌクレオチドも好ましく使用できる。また、本ポリヌクレオチドの配列情報に基づき設計したセンスプライマー、アンチセンスプライマーをかかえるプローブとして用いることもできる。

【0025】

c D N Aライブラリーからの所望のクローンの選択は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して各クローンについて発現蛋白質の確認を行い、さらに該蛋白質の機能を指標にして実施できる。本ポリヌクレオチドがコードする蛋白質の機能としては、例えば、R h o A、C d c 4 2およびR a c 1等のR h oファミリー蛋白質と結合する機能およびR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能が挙げられる。蛋白質発現系としては、自体公知の発現系がいずれも利用可能であるが、無細胞蛋白質発現系の利用が簡便である（非特許

文献 11)。

【0026】

ここで、「R h oファミリー蛋白質の活性化」とは、R h oファミリー蛋白質に結合したグアノシン5'-二リン酸(GDP)をグアノシン5'-三リン酸(GTP)に交換する反応を意味する。本反応は、R h oファミリー蛋白質からのGDPの解離反応と、その結果生成したヌクレオチドに結合していないR h oファミリー蛋白質へのGTPの結合反応からなる。「R h oファミリー蛋白質の活性化の促進」とは、本反応の律速段階であるR h oファミリー蛋白質からのGDPの解離反応を促進することを意味する。

【0027】

本発明に係るポリヌクレオチドの取得にはその他、ポリメラーゼ連鎖反応(以下、PCRと略称する、非特許文献12-14)によるDNA/RNA増幅法が好適に利用できる。cDNAライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、RACE法(非特許文献15)、特に5'-RACE法(非特許文献16)等の採用が好適である。PCRに使用するプライマーは、ポリヌクレオチドの塩基配列情報に基づいて適宜設計でき、常法に従って合成により得ることができる。増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、常法により行うことができる。例えばゲル電気泳動法等により実施可能である。

【0028】

かくして得られるポリヌクレオチドの塩基配列の決定は、常法、例えばジデオキシ法(非特許文献17)やマキサムーギルバート法(非特許文献18)等により、また簡便には市販のシーケンスキット等を用いて行うことができる。

【0029】

本発明に係るポリヌクレオチドは上記ポリヌクレオチドに限定されず、上記ポリヌクレオチドと配列相同性を有し、かつR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを包含する。配列相同性は、通常、塩基配列の全体で約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上であることが適当である。さらにより好ましくは、DH/PHドメインコード領域を有するポリヌクレオチドが望ましい。DH/PHドメインコード領域における配列相同性は約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上であることが適当である。またDH/PHドメインがその機能、例えばR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を保持していることがさらに好ましい。

【0030】

本発明に係るポリヌクレオチドには、上記ポリヌクレオチドの塩基配列において1個以上、例えば1~100個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個、特に好ましくは1個乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加または挿入といった変異が存する塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドが包含される。変異の程度およびそれらの位置等は、該変異を有するポリヌクレオチドがR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質、より好ましくはDH/PHドメインを有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドである限り特に制限されない。かかる変異を有するポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドであってよく、誘発変異を有するポリヌクレオチドであってよい。また、天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得たポリヌクレオチドであってもよい。変異を導入する方法は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはPCR等を、単独でまたは適宜組合せて用いることができる。例えば成書に記載の方法(非特許文献9および10)に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、ウルマーの技術(非特許文献12)を利用することもできる。

【0031】

本発明に係るポリヌクレオチドとしてはまた、上記ポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドを例示できる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば成書に記載の方法(非特許文献9)等に従うことができる。

これらポリヌクレオチドは本ポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドであれば相補的配列を有するポリヌクレオチドでなくてもよい。好ましくは、コードする蛋白質がR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質であり、より好ましくはD H / P Hドメインを有する蛋白質であることが望ましい。

【0032】

本発明に係るポリヌクレオチドには、上記ポリヌクレオチドの指定された領域に存在する部分塩基配列で表わされるオリゴヌクレオチドが含まれる。このようなオリゴヌクレオチドは、その最小単位として好ましくは該領域において連続する5個以上のヌクレオチド、より好ましくは10個以上、より好ましくは20個以上のヌクレオチドからなる。これらオリゴヌクレオチドは、本発明に係るポリヌクレオチドの塩基配列情報に従って、所望の配列を設計し、自体公知の化学合成法により製造することができる。簡便には、D N A / R N A自動合成装置を用いて取得可能である。

【0033】

本発明に係るポリヌクレオチドとして、配列表の配列番号7、8、9または10に記載の塩基配列で表わされるオリゴヌクレオチドを好ましく例示できる。これらのオリゴヌクレオチドは、本遺伝子または本遺伝子断片を増幅するためのプライマー、本遺伝子またはその転写産物を検出するためのプローブ等として用いることができる。

【0034】

本発明に係るポリヌクレオチドはヒト由来のポリヌクレオチドであるが、本ポリヌクレオチドと配列相同性を有し、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチド、好ましくはD H / P Hドメインコード領域を有するポリヌクレオチドである限りにおいて、哺乳動物由来のポリヌクレオチド、例えばマウス、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ラットまたはウサギ等由来のポリヌクレオチドも本発明に含まれる。

【0035】

本発明に係るポリヌクレオチドは、その発現あるいはそれがコードする蛋白質の機能、例えばR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能が阻害されない限りにおいて、5'末端側や3'末端側に所望の遺伝子が付加されたポリヌクレオチドであってよい。本ポリヌクレオチドに付加することのできる遺伝子として、具体的には例えばグルタチオンSートランスフェラーゼ(G S T)、 β -ガラクトシダーゼ(β -G a l)、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(H R P)またはアルカリホスファターゼ(A L P)等の酵素類、あるいはH i s - t a g、M y c - t a g、H A - t a g、F L A G - t a gまたはX p r e s s - t a g等のタグペプチド類等の遺伝子が例示できる。これら遺伝子から選択した1種類または複数種類の遺伝子を組合せて付加することができる。これら遺伝子の付加は、慣用の遺伝子工学的手法により行うことができ、遺伝子やm R N Aの検出を容易にするために有用である。

【0036】

(ベクター)

本発明の一態様は、本発明に係るポリヌクレオチドを含有する組換えベクターに関する。本組換えベクターは、本ポリヌクレオチドを適当なベクターD N Aに挿入することにより得ることができる。

【0037】

ベクターD N Aは宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターD N Aは、天然に存在するD N Aを抽出して得られたベクターD N Aの他、複製に必要な部分以外のD N Aの部分が一部欠落しているベクターD N Aでもよい。代表的なベクターD N Aとして例えば、プラスミド、バクテリオファージおよびウイルス由来のベクターD N Aを挙げることができる。プラスミドD N Aとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド等を例示できる。バクテリオファージD N Aとしては、 λ ファージ等が挙げられる。ウイルス由来のベクターD N Aとしては例えばレトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウ

イルス、パポバウイルス、SV40、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウイルス等の動物ウイルス由来のベクター、あるいはバキュロウイルス等の昆虫ウイルス由来のベクターが挙げられる。その他、トランスポゾン由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来のベクターDNA等を例示できる。あるいは、これらを組合せて作成したベクターDNA、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメントを組合せて作成したベクターDNA（コスミドやファージミド等）を例示できる。

【0038】

ベクターDNAは、発現ベクターやクローニングベクター等、目的に応じていずれを用いることもできる。本発明に係るポリヌクレオチドを含有する組換え発現ベクターは、本ポリヌクレオチドがコードする蛋白質の製造に使用可能である。

【0039】

ベクターDNAには、本発明に係るポリヌクレオチドの機能が発揮されるように該ポリヌクレオチドを組み込むことが必要であり、少なくとも本ポリヌクレオチドとプロモーターとをその構成要素とする。これら要素に加えて、所望によりさらに、複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列を組合せて自体公知の方法によりベクターDNAに組み込むことができる。かかる遺伝子配列として、例えば、リボソーム結合配列、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル、および選択マーカー（ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等）等を例示できる。これらから選択した1種類または複数種類の遺伝子配列をベクターDNAに組み込むことができる。

【0040】

ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組み込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、本ポリヌクレオチドを含む遺伝子を適当な制限酵素により処理して特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターDNAと混合し、リガーゼにより再結合する方法が用いられる。あるいは、本ポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。

【0041】

（形質転換体）

本発明の一態様は、本発明に係る組換えベクターにより、宿主を形質転換して得られる形質転換体に関する。本発明に係るポリヌクレオチドを含有する組換え発現ベクターを導入した形質転換体は、本ポリヌクレオチドがコードする蛋白質の製造に有用である。本形質転換体には、本ポリヌクレオチド以外の所望の遺伝子を含有するベクターDNAの1種類または複数種類をさらに導入することができる。本ポリヌクレオチド以外の所望の遺伝子を含有するベクターDNAとして、例えば、RhoA、Rac1またはCdc42等のRhoファミリー蛋白質をコードする遺伝子を含有するベクターDNAが挙げられる。本ポリヌクレオチドを含有する発現ベクターとRhoファミリー蛋白質をコードする遺伝子を含有する発現ベクターとにより形質転換して得られる形質転換体は、本ポリヌクレオチドによるRhoファミリー蛋白質の活性化促進を阻害する化合物の同定方法に使用できる。このような形質転換として好ましくは、本発明に係る組換えベクターとCdc42をコードするポリヌクレオチドを含有する組換えベクターとにより形質転換して得られる形質転換体が挙げられる。

【0042】

宿主としては、原核生物および真核生物のいずれも用いることができる。原核生物としては、例えば大腸菌（エシェリヒアコリ（*Escherichia coli*））等のエシェリヒア属、枯草菌等のバシラス属、シュードモナスプチダ（*Pseudomonas putida*）等のシュードモナス属、リゾビウムメリロティ（*Rhizobium meliloti*）等のリゾビウム属に属する細菌が挙げられる。真核生物としては、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞等の動物細胞を例示できる。酵母は、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセ

スポンベ (Schizosaccharomyces pombe) 等が挙げられる。昆虫細胞は、Sf9細胞やSf21細胞等を例示できる。哺乳動物細胞は、サル腎由来細胞 (COS細胞、Vero細胞等)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、マウスL細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞や293EBNA細胞等が例示できる。好ましくは哺乳動物細胞を用いる。最も好ましくは、293EBNA細胞を用いる。

【0043】

ベクターDNAの宿主細胞への導入は、自体公知の手段が応用され、例えば成書に記載されている標準的な方法 (非特許文献9) により実施できる。より好ましい方法としては、遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷 (scrape loading)、バリスティック導入 (ballistic introduction) および感染等が挙げられる。

【0044】

原核生物を宿主とする場合、組換えベクターが該原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明に係るポリヌクレオチド、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。細菌を宿主とする場合、プロモーターとしては大腸菌等の細菌中で発現できるプロモーターであればいずれも利用可能である。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター等の、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tacプロモーター等の人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、いずれも利用可能である。好ましくは例えば、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等を利用できる。

哺乳動物細胞を宿主とする場合、組換えベクターが該細胞中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、RNAスプライス部位、本発明に係るポリヌクレオチド、ポリアダニル化部位、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、所望により複製起点が含まれていてもよい。プロモーターとしてはSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、サイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。哺乳動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、好ましくは例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を利用できる。最も好ましくは、リポフェクション法を用いる。

酵母を宿主とする場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるプロモーターであれば特に限定されず、例えば、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、好ましくは例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を利用できる。

昆虫細胞を宿主とする場合、組換えベクターの導入方法としては、好ましくは例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等を利用できる。

【0045】

(蛋白質)

本発明の一態様は、本発明に係るポリヌクレオチドがコードする蛋白質に関する。

【0046】

本発明に係る蛋白質の具体的態様としては、例えば配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質を挙げることができる。より具体的には、かかる蛋白質として配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質を例示できる。本蛋白質において、その第97番目バリン (Val) から第271番目アスパラギン酸 (A

s p)までのアミノ酸配列にDHドメインが、第297番目ロイシン(L e u)から第394番目ロイシン(L e u)までのアミノ酸配列にPHドメインが存在する。第97番目バリン(V a l)から第394番目ロイシン(L e u)までのアミノ酸配列にDH／PHドメインが存在する。

【0047】

本発明に係る蛋白質としてまた、配列番号3または5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質を挙げることができる。より具体的には、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質として配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質を例示できる。また、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質として配列番号6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質を例示できる。配列番号4に記載のアミノ酸配列は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の第90番目のリジン(L y s)から第454番目のロイシン(L e u)までのアミノ酸配列に相当する。また、配列番号6に記載のアミノ酸配列は、配列番号4に記載のアミノ酸配列のN末端にメチオニンがペプチド結合により付加されたアミノ酸配列である。すなわち、これら各アミノ酸配列で表わされる蛋白質は、DH／PHドメインを含んでいる。

【0048】

本発明に係る蛋白質は、好ましくはR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質である。かかる蛋白質として、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質を好ましく例示できる。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドと、R h o A、C d c 4 2およびR a c 1といった各R h oファミリー蛋白質をコードする遺伝子とを共に発現させた動物細胞において、該ポリヌクレオチドがコードする蛋白質は各R h oファミリー蛋白質と結合することがブルダウン法により判明した(実施例3参照)。また、当該動物細胞において、C d c 4 2の活性化が促進された(実施例4参照)。これらから、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、R h oファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考える。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質のN末端にメチオニンがペプチド結合により付加された蛋白質である。配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの発現を目的として該ポリヌクレオチドの5'末端にコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド(配列番号19)を付加した結果、得られた蛋白質である。付加されたメチオニンは、発現された蛋白質の機能に大きな影響を与えない。したがって、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、N末端のメチオニンが付加されていないが、R h oファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考える。

【0049】

配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、上記のように、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質と同様、R h oファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考えられる。また、これら蛋白質に含まれるDH／PHドメインは、R h oファミリー蛋白質の活性化に寄与する重要なドメインであることが知られている。これらから、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質を含有する蛋白質もR h oファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考える。かかる蛋白質として、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドがコードする蛋白質が挙げられる。また、配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドがコードする蛋白質が挙げられる。具体的には、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドがコードする蛋白質として、配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質が例示できる。配列番号1に記載の塩基配列で表わ

されるポリヌクレオチドがコードする蛋白質としては、配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質が挙げられる。これら例示した蛋白質はいずれも、R h oファミリー蛋白質と結合してその活性化を促進すると考える。

【0050】

本発明の範囲には、配列番号3に記載の塩基配列若しくはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドまたは配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドであって、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドがコードする蛋白質も包含される。

【0051】

本発明に係る蛋白質は上記蛋白質に限定されず、本発明に係るポリヌクレオチドがコードする蛋白質であればいずれも本発明の範囲に包含される。好ましくは、本発明に係るポリヌクレオチドがコードする蛋白質であって、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質が望ましい。かかる蛋白質としては、例えば、配列番号1に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、配列番号2に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、配列番号3若しくは5に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチド、および配列番号4若しくは6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補的塩基配列で表わされるポリヌクレオチドからなる群より選ばれるいずれか1のポリヌクレオチドの塩基配列と少なくとも70%の相同性を有する塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであって、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドがコードする蛋白質が挙げられる。また、例えば、上記ポリヌクレオチド群より選ばれるいずれか1のポリヌクレオチドの塩基配列において1乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加等の変異あるいは誘発変異を有する塩基配列で表わされるポリヌクレオチドであって、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドがコードする蛋白質が挙げられる。さらに、上記ポリヌクレオチド群より選ばれるいずれか1のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドであって、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する蛋白質をコードするポリヌクレオチドがコードする蛋白質であってもよい。

【0052】

本発明に係るこのような蛋白質として、より具体的には、配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質と配列相同性を有し、かつR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質が例示できる。配列相同性は、通常、アミノ酸配列の全体で約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上であることが適当である。さらにより好ましくは、DH/P Hドメインを有する蛋白質が望ましい。DH/P Hドメインにおける配列相同性は約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上であることが適当である。またDH/P Hドメインがその機能、例えばR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を保持していることがさらに好ましい。また、本蛋白質として、配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列において1個以上、例えば1~100個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個、特に好ましくは1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入といった変異を有するアミノ酸配列で表わされ、かつR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質が例示できる。アミノ酸の変異の程度およびそれらの位置等は、該変異を有する蛋白質が、R h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質、より好ましくはDH/P Hドメインを有する蛋白質である限り特に制限されない。かかる変異を有する蛋白質は、天然において例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じたものであってよく、また天然由来の遺

伝子に基づいて変異を導入して得たものであってもよい。変異を導入する方法は自体公知であり、例えば、公知の遺伝子工学的技術を利用して実施できる。変異の導入において、当該蛋白質の基本的な性質（物性、機能、生理活性または免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等）の間での相互の置換は容易に想定される。

【0053】

本発明に係る蛋白質にはさらに、上記蛋白質の部分配列で表わされる蛋白質が包含される。例えば、配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質の部分配列で表わされる蛋白質も本発明の範囲に包含される。かかる蛋白質は、その最小単位として好ましくは5個以上、より好ましくは8個以上、さらに好ましくは12個以上、特に好ましくは15個以上の連続するアミノ酸で表わされる。

【0054】

本発明に係る蛋白質はヒト由来の蛋白質であるが、本蛋白質と配列相同性を有し、かつRhofファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を有する蛋白質、好ましくはDH／PHドメインを有する蛋白質である限りにおいて、哺乳動物由来の蛋白質、例えばマウス、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ラットまたはウサギ等由来の蛋白質も本発明に包含される。

【0055】

本発明に係る蛋白質は、該蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体生物由来の生物学的試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。

【0056】

本発明に係る蛋白質はさらに、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない限りにおいて改変が可能である。また、N末端側やC末端側に別の蛋白質等を、直接的に、またはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加することにより標識化したものであってよい。好ましくは、本蛋白質の基本的な性質が阻害されないような標識化が望ましい。さらに好ましくは、本蛋白質のRhofファミリー蛋白質の活性化促進機能が阻害されないような標識化が望ましい。標識化に用いる物質（標識物質）としては、例えばGST、 β -Gal、HRPまたはALP等の酵素類、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはExpress-tag等のタグペプチド類、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate）またはフィコエリスリン（phycoerythrin）等の蛍光物質類、マルトース結合蛋白質、免疫グロブリンのFc断片あるいはビオチン等が例示できるが、これらに限定されない。また、放射性同位元素による標識化も可能である。標識物質は、1種類または複数種類を組合せて本蛋白質に付加することができる。これら標識物質自体またはその機能の測定により、本蛋白質を容易に検出または精製可能であり、また、例えば本蛋白質と他の蛋白質との結合の検出や本蛋白質の機能の測定が可能である。

【0057】

（蛋白質の製造方法）

本発明の一態様は、本発明に係る蛋白質の製造方法に関する。本蛋白質は、例えば本蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列情報に基づいて一般的遺伝子工学的手法（非特許文献9、10、12および13等を参照）により取得可能である。例えば、本発明に係るポリヌクレオチドの発現が確認されている各種の細胞や組織、またはこれらに由来する培養細胞から常法に従ってcDNAライブラリーをまず調製する。次いで、本蛋白質をコードする遺伝子に選択的にハイブリダイゼーションするプライマーを用いて、該cDNAライブラリーから本ポリヌクレオチドを増幅する。得られたポリヌクレオチドの発現誘導を公知の遺伝子工学的手法を利用して行うことにより、本蛋白質を取得できる。

【0058】

具体的には例えば、本発明に係る形質転換体を培養し、次いで得られた培養物から本蛋白質を回収することにより、本蛋白質を製造できる。本形質転換体の培養は、各々の宿主に最適な自体公知の培養条件および培養方法で行うことができる。培養は、形質転換体により発現される本蛋白質自体または本蛋白質の機能、例えばR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を指標にして実施できる。あるいは、宿主中または宿主外に産生された本蛋白質自体またはその蛋白質量を指標にして培養してもよく、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養を行ってもよい。

【0059】

本発明に係る蛋白質が形質転換体の細胞内あるいは細胞膜上に発現する場合には、形質転換体を破砕して本蛋白質を抽出する。また、本蛋白質が形質転換体外に分泌される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離処理等により形質転換体を除去した培養液を用いる。

【0060】

本発明に係る蛋白質は、所望により、形質転換体を培養した培養液または形質転換体から、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種分離操作方法により分離および／または精製することができる。分離および／または精製は、本蛋白質の機能、例えばR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を指標にして実施できる。分離操作方法としては、例えば硫酸アンモニウム沈殿、限外ろ過、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、透析法等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。好ましくは、本蛋白質のアミノ酸配列情報に基づき、これらに対する特異的抗体を作製し、該抗体を用いて特異的に吸着する方法、例えば該抗体を結合させたカラムを利用するアフィニティークロマトグラフィーを用いることが推奨される。

【0061】

本発明に係る蛋白質はまた、一般的な化学合成法により製造することができる。蛋白質の化学合成方法として、例えば、固相合成方法、液相合成方法等が知られているがいずれも利用可能である。かかる蛋白質合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させて鎖を延長させていくいわゆるステップワイズエロンゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメントコンデンセーション法とを包含する。本蛋白質の合成は、そのいずれによっても行うことができる。上記蛋白質合成法において利用される縮合法も常法に従うことができる。縮合法として、例えば、アジド法、混合酸無水物法、D C C法、活性エステル法、酸化還元法、D P P A（ジフェニルホスホリルアジド）法、D C C + 添加物（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等）法、ウッドワード法等が例示できる。化学合成により得られる本蛋白質はさらに、上記のような慣用の各種精製方法により適宜精製を行うことができる。

【0062】

本発明に係る蛋白質の部分配列で表わされる蛋白質は、本蛋白質を適当なペプチダーゼにより切断することによっても得ることができる。

【0063】

（抗体）

本発明の一態様は、本発明に係る蛋白質を認識する抗体に関する。本抗体は、本蛋白質を抗原として用いて作製することができる。抗原は、本蛋白質またはその断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。本蛋白質に特異的な抗体を作成するためには、本蛋白質に固有なアミノ酸配列からなる領域を抗原として用いることが好ましい。この領域のアミノ酸配列は、必ずしも該蛋白質またはその断片のアミノ酸配列と同一である必要はなく、その立体構造上の外部への露出部位が好ましい。露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であれば

よい。本抗体は本蛋白質を特異的に認識する抗体であればいずれであってもよく、特に限定されない。本蛋白質を特異的に認識するとは、本蛋白質を認識する、例えば本蛋白質に結合するが、本蛋白質以外の蛋白質は認識しないか、弱く認識することを意味する。認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応により決定できる。

【0064】

抗体の産生には、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、抗原をアジュバントの存在下または非存在下で、単独でまたは担体に結合して動物に投与し、体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより抗体が得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用を示さずかつ抗原性を増強せしめる限りにおいて、公知の担体をいずれも使用できる。具体的には、セルロース、重合アミノ酸、アルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニン等を例示できる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント（FCA）、フロイント不完全アジュバント（FIA）、Rib i（MPL）、Rib i（TDM）、Rib i（MPL+TDM）、百日咳ワクチン（Bordetella pertussis vaccine）、ムラミルジペプチド（MDP）、アルミニウムアジュバント（ALUM）、およびこれらの組み合わせを例示できる。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

【0065】

ポリクローナル抗体は、免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法により取得できる。好ましい抗体回収手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法が挙げられる。

【0066】

モノクローナル抗体は、免疫手段が施された動物から抗体産生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P3-X63-Ag8株等のミエローマ株）への形質転換手段を導入することにより生産できる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化する。クローン化した種々のハイブリドーマから、本発明に係る蛋白質を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

【0067】

本発明に係る蛋白質を認識または結合し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、該蛋白質の精製用抗体、試薬または標識マーカー等として利用できる。特に本蛋白質の機能を阻害する抗体は、本蛋白質の機能調節に使用でき、本蛋白質の機能異常や量的異常に起因する各種疾患の解明、防止、改善および／または治療のために有用である。

【0068】

（化合物の同定方法）

本発明の一態様は、本発明に係る蛋白質の機能を阻害する化合物、あるいは本発明に係るポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法に関する。本同定方法は、本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体または抗体のうち少なくともいずれか1種類を用いて、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施可能である。本同定方法は、インビトロまたはインビボで実施されるいずれ方法も包含する。本同定方法により、本蛋白質の立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現の阻害剤の選別、または抗体を利用した抗体認識物質の選別等が可能である。

【0069】

本発明に係る蛋白質の機能を阻害する化合物の同定方法は、本蛋白質の機能を測定することのできる実験系において、本蛋白質と調べようとする化合物（被検化合物）の相互作用を可能にする条件下で、本蛋白質と被検化合物とを共存させてその機能を測定し、次いで、被検化合物の存在下における本蛋白質の機能と、被検化合物の非存在下における本蛋白質の機能とを比較し、本蛋白質の機能の存在、不存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現を検出することにより実施可能である。被検化合物の非存在下における本蛋白質

質の機能と比較して、被検化合物の存在下における本蛋白質の機能が低減または消失する場合、該被検化合物は本蛋白質の機能を阻害すると判定できる。機能の測定は、該機能の直接的な検出により、または例えば機能の指標となるシグナルを実験系に導入して該シグナルを検出することにより実施可能である。シグナルとしては、G S T等の酵素類、H i s - t a g、M y c - t a g、H A - t a g、F L A G - t a gまたはX p r e s s - t a g等のタグペプチド類、または蛍光蛋白質等を用いることができるが、一般的に化合物の同定方法に用いられている標識物質であれば、いずれも利用可能である。

【0070】

本発明に係る蛋白質の機能としては、例えばR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能およびR h oファミリー蛋白質と結合する機能が挙げられる。

【0071】

本発明に係る蛋白質のR h oファミリー蛋白質との結合機能を指標にした同定方法は、例えば、本蛋白質を遺伝子工学的手法により発現させて取得し、被検化合物の存在下または非存在下におけるR h oファミリー蛋白質との結合の検出を行うことにより実施できる。具体的には、例えばR h oファミリー蛋白質を遺伝子工学的手法によりG S T - t a g融合蛋白質として発現させ、その後グルタチオンセファロースに結合させ、被検化合物の存在下または非存在下で、本蛋白質と反応させる。グルタチオンセファロースに結合させたR h oファミリー蛋白質に結合する本蛋白質を定量することにより、本蛋白質のR h oファミリー蛋白質との結合機能を阻害する化合物の同定が可能である。被検化合物の非存在下における両蛋白質の結合と比較して、被検化合物の存在下における両蛋白質の結合が低減または消失する場合、該被検化合物は本蛋白質のR h oファミリー蛋白質との結合機能を阻害すると判定できる。本蛋白質の定量は、例えば、本発明に係る抗体を用いて実施できる。抗体は、H R PやA L P等の酵素、放射性同位元素、蛍光物質またはビオチン等の標識物質で標識した抗体を用いることができる。あるいは、標識した二次抗体を用いてもよい。本蛋白質として、タグペプチドを融合した蛋白質を用いれば、抗タグ抗体を用いて定量を実施できる。または、本蛋白質を上記酵素、放射性同位元素、蛍光物質、ビオチン等の標識物質で直接標識して用いてもよい。このような場合、標識物質を測定することにより、本蛋白質の定量が可能である。

【0072】

より具体的には、本発明に係る蛋白質をコードするポリヌクレオチドとR h oファミリー蛋白質をコードするポリヌクレオチドとを共発現させた適当な細胞を用い、両蛋白質の結合をプルダウン法により検出する実験系（実施例3参照）を用いて、該結合を阻害する化合物を同定できる。

【0073】

本発明に係る同定方法に、公知のツーハイブリッド（t w o - h y b r i d）法を用いることも可能である。例えば、本発明に係る蛋白質とD N A結合蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、R h oファミリー蛋白質と転写活性化蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、および適切なプロモーター遺伝子に接続したレポーター遺伝子を含むプラスミドを、酵母または真核細胞等に導入する。次いで、被検化合物の存在下におけるレポーター遺伝子の発現量と、被検化合物の非存在下におけるレポーター遺伝子の発現量との比較により、本蛋白質とR h oファミリー蛋白質との結合を阻害する化合物の同定を達成できる。被検化合物の非存在下におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、被検化合物の存在下におけるレポーター遺伝子の発現量が減少または消失する場合、該被検化合物は本蛋白質のR h oファミリー蛋白質との結合機能を阻害すると判定できる。レポーター遺伝子は、レポーターアッセイで一般的に用いられている遺伝子を使用可能であるが、例えばルシフェラーゼ、 β -G a lまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ等の酵素活性を有する遺伝子が例示できる。レポーター遺伝子の発現の検出は、その遺伝子産物の活性、例えば、上記例示したレポーター遺伝子の場合には酵素活性を検出することにより実施可能である。

【0074】

本発明に係る蛋白質とR h oファミリー蛋白質との結合を阻害する化合物の同定方法はまた、ピアコアシステム（B I A C O R E s y s t e m）等の表面プラズモン共鳴センサーを用いて実施可能である。あるいは、シンチレーションプロキシミティアッセイ法（S c i n t i l l a t i o n p r o x i m i t y a s s a y、S P A）や蛍光共鳴エネルギー転移（F l u o r e s c e n c e r e s o n a n c e e n e r g y t r a n s f e r、F R E T）を応用した方法を用いて、本同定方法を実施可能である。

【0075】

本発明に係る蛋白質が有するR h oファミリー蛋白質の活性化促進機能を指標にした同定方法は、例えば、本蛋白質と該蛋白質により活性化が促進されるR h oファミリー蛋白質とを共存させ、活性化されたR h oファミリー蛋白質の量を、被検化合物の存在下または非存在下において測定することにより実施できる。被検化合物の非存在下における活性化されたR h oファミリー蛋白質の量と比較し、被検化合物の存在下における該蛋白質の量が減少する場合、該化合物は、本蛋白質が有するR h oファミリー蛋白質の活性化促進機能を阻害すると判定できる。活性化されたR h oファミリー蛋白質は、該蛋白質に対する抗体等を用いて定量され得る。例えば、活性化されたR h oファミリー蛋白質は、活性化されたR h oファミリー蛋白質には結合するが、活性化されていないR h oファミリー蛋白質には結合しないか弱く結合するエフェクター分子を用いて定量され得る。具体的には、実施例4に示すように、エフェクター分子の活性化されたR h oファミリー蛋白質との結合部位を含む蛋白質にG S T－t a gを付加した蛋白質と、活性化されたR h oファミリー蛋白質との結合をプルダウン法により検出し、さらに活性化されたR h oファミリー蛋白質の量を電気泳動法およびウエスタンブロット法により測定する。R h oファミリー蛋白質によって、活性化された該蛋白質と結合するエフェクター分子は異なる。したがって、用いるR h oファミリー蛋白質の種類により適当なエフェクター分子を選択して用いる。例えば、活性化されたC d c 4 2および活性化されたR a c 1は、そのエフェクター分子であるP A K－1に結合することが知られている。また、活性化されたR h o Aは、そのエフェクター分子であるR h o t e k i nに結合する。

【0076】

本発明に係る蛋白質が有するR h oファミリー蛋白質の活性化促進機能を指標にした同定方法はまた、本蛋白質、該蛋白質により活性化が促進されるR h oファミリー蛋白質であって放射性同位元素で標識したG D Pと結合しているR h oファミリー蛋白質およびG T Pを共存させ、活性化されたR h oファミリー蛋白質の量を被検化合物の存在下または非存在下において測定することにより実施できる。活性化されたR h oファミリー蛋白質は、放射性同位元素で標識したG D Pと結合しているR h oファミリー蛋白質の量の減少により定量され得る。

【0077】

「R h oファミリー蛋白質の活性化促進機能を阻害する」とは、本発明に係る蛋白質により促進される、R h oファミリー蛋白質の活性化において、該促進を阻害することを意味する。

【0078】

本発明に係る同定方法において用いるR h oファミリー蛋白質は、本発明に係る蛋白質との結合および本蛋白質による活性化の促進に影響がない限りにおいて、一部を欠損した蛋白質であってよく、あるいは上記のような標識物質が付加された蛋白質であってよい。

【0079】

本発明に係るポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法は、本ポリヌクレオチドの発現を測定することのできる実験系において、本ポリヌクレオチドと被検化合物の相互作用を可能にする条件下で、本ポリヌクレオチドと被検化合物とを共存させてその発現を測定し、次いで、被検化合物の存在下における本ポリヌクレオチドの発現と、被検化合物の非存在下における本ポリヌクレオチドの発現とを比較し、本ポリヌクレオチドの発現の存在、不存在または変化、例えば低減、増加、消失、出現を検出することにより実施可能である。被検化合物の非存在下における本ポリヌクレオチドの発現と比較して、被検

化合物の存在下における本ポリヌクレオチドの発現が減少または消失する場合、該被検化合物は本ポリヌクレオチドの発現を阻害すると判定できる。具体的には例えば、本同定方法は、本発明に係る形質転換体を用いて本ポリヌクレオチドを発現させる実験系において、該形質転換体と被検化合物とを接触させた後に、本ポリヌクレオチドの発現を測定することにより実施可能である。発現の測定は、簡便には発現される蛋白質の量、あるいは該蛋白質の機能、例えばR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能を指標にして実施できる。また、例えば発現の指標となるシグナルを実験系に導入して該シグナルを検出することにより、発現の測定が可能である。シグナルとしては、G S T等の酵素類、H i s - t a g、M y c - t a g、H A - t a g、F L A G - t a gまたはX p r e s s - t a g等のタグペプチド類、または蛍光物質等を用いることができる。これらシグナルの検出方法は当業者には周知である。

【0080】

本発明に係るポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物の同定方法はまた、例えば本ポリヌクレオチドを含む遺伝子のプロモーター領域の下流に、該ポリヌクレオチドの代わりにレポーター遺伝子を連結したベクターを作成し、該ベクターを導入した細胞、例えば真核細胞等と被検化合物とを接触させ、レポーター遺伝子の発現の存在、不存在または変化を測定することにより実施可能である。レポーター遺伝子としては、レポーターアッセイで一般的に用いられている遺伝子を使用可能であるが、例えばルシフェラーゼ、 β -G a lまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ等の酵素活性を有する遺伝子を用いることができる。レポーター遺伝子の発現の検出は、その遺伝子産物の活性、例えば、上記に例示したレポーター遺伝子の場合には酵素活性を検出することにより実施可能である。

【0081】

(化合物)

本発明に係る同定方法により得られた化合物は、本発明に係る蛋白質の機能、例えばR h oファミリー蛋白質の活性化を促進する機能の阻害剤、拮抗剤等の候補化合物として利用可能である。また、本発明に係るポリヌクレオチドの発現阻害剤の候補化合物としても利用可能である。これら候補化合物は、その有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより医薬として調製可能であり、本蛋白質の機能の異常および／または本ポリヌクレオチドの発現の異常に起因する各種病的症状の防止効果および／または治療効果を期待できる。また、本発明に係る化合物は、本同定方法以外の方法により得られた化合物であって、本蛋白質の機能を阻害するおよび／または本ポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物も含まれる。

【0082】

(医薬組成物)

本発明の一態様は、本発明に係る蛋白質、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、または化合物を有効成分として含み、本蛋白質の機能および／または本ポリペプチドの発現を阻害するまたは拮抗することに基づく医薬または医薬組成物に関する。

【0083】

本発明に係る医薬は、本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、抗体、または化合物のうち少なくともいずれか1つを有効成分としてその有効量含む医薬となしてもよい。通常は、1種類または2種類以上の医薬用許容される担体（医薬用担体）を用いて医薬組成物を製造することが好ましい。

【0084】

本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択される。通常約0.00001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%程度の範囲とするのが適当である。

【0085】

医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示できる。これらは得られる製剤

の投与形態に応じて適宜選択使用される。

【0086】

例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。

【0087】

所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等を適宜使用して調製することもできる。

【0088】

安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。

【0089】

界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。

【0090】

緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等を例示できる。

【0091】

等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示できる。

【0092】

キレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。

【0093】

本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる。その他、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

【0094】

本発明に係る医薬および医薬組成物は、本発明に係る蛋白質の機能の異常および／または本ポリヌクレオチドの発現の異常に基づく疾患の防止剤および／または治療剤として使用することができる。また、当該疾患の防止方法および／または治療方法に使用することができる。

【0095】

本発明に係る蛋白質の機能および／または本発明に係るポリヌクレオチドの発現の過剰に関連する異常な症状に対しては、例えば本蛋白質の機能および／または本ポリヌクレオチドの発現を阻害する有効量の阻害剤を医薬上許容される医薬用担体とともに対象に投与することにより異常な症状を防止、改善または治療することができる。あるいは、内在性の本ポリヌクレオチドの発現を、発現ブロック法を用いて阻害してもよい。例えば本ポリヌクレオチドの部分配列からなるオリゴヌクレオチドをアンチセンスオリゴヌクレオチドとして遺伝子治療に用いて、本ポリヌクレオチドの発現を阻害できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いるオリゴヌクレオチドは、本ポリヌクレオチドの翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものであっても有用である。本ポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害するためには、該ポリヌクレオチドに固有な領域の塩基配列を用いることが好ましい。

【0096】

本発明に係るポリヌクレオチドの一態様である配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの組織発現は、胃腫瘍の1つである胃腺癌様腫瘍（stomach adenocarcinoid tumor）で正常胃組織と比較して約5倍、4.5倍以上高いことが判明した。配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質にはRho-GEFの活性ドメインであるDH/PHドメインが存在する。一方、配列番号1に記載の塩基配列の第581番目から第1675番目までの塩基配列で表わされるポリヌクレオチド（配列番号3）の5'末端にコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド（配列番号19）が付加されたポリヌクレオチド（配列番号5）は、DH/PHドメインコード領域を有し、Rhoファミリー蛋白質をコードする遺伝子と共発現させた動物細胞において、Rhoファミリー蛋白質と結合しその活性化を促進した。このことから、配列番号5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、Rho-GEFとして作用すると考えられる。配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの5'末端に付加されたコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド（配列番号19）は、発現された蛋白質の機能に大きな影響を与えない。したがって、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質も、Rho-GEFとして作用すると考える。また、配列番号1に記載の塩基配列は配列番号3に記載の塩基配列を含むため、配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドがコードする蛋白質も、Rhoファミリー蛋白質と結合してRho-GEFとして作用すると考えられる。Rho-GEFとして単離された遺伝子には、vav（非特許文献3および4）、ost（非特許文献5）、ibc（非特許文献6）等の癌に関連する遺伝子が知られている。これらから、本ポリヌクレオチドの高発現は胃腫瘍に関連すると考える。したがって、本発明に係る医薬および医薬組成物は、胃腫瘍の防止剤および／または治療剤として有用である。さらに、胃腫瘍の防止方法および／または治療方法に使用できる。

【0097】

本発明に係る医薬および医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等）、および担当医師の判断等に応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり約0.01μg乃至100mg程度、好ましくは約0.1μg～1mg程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。上記投与量は1日1～数回に分けて投与することができ、数日または数週間に1回の割合で間欠的に投与してもよい。

【0098】

本発明に係る医薬または医薬組成物を投与するときには、該医薬または医薬組成物を単独で使用してよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

【0099】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。癌疾患に用いる場合は、腫瘍に注射等により直接投与することが好ましい。

【0100】

投与形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的な例としては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リボソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

【0101】

（診断方法）

本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、抗体または化合物は、それ自体を、診断マーカーや診断試薬等の疾患診断手段として使用できる。

本発明によれば、例えば本発明に係るポリヌクレオチドの一部または全部のポリヌクレオチドを利用することにより、個体または各種組織における該ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む遺伝子の異常の有無あるいは発現の有無を特異的に検出することができる。本発明に係るポリヌクレオチドの検出により、該ポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む遺伝子の量的異常および／または機能異常等に基づく疾患の易罹患性、発症、および／または予後の診断が可能である。

【0102】

疾患の診断は、例えば調べようとする試料（被検試料）について、本発明に係るポリヌクレオチドの存在を検出すること、その存在量を決定すること、および／またはその変異を同定することにより実施できる。正常な対照試料との比較において、本ポリヌクレオチドの存在の変化、その量的変化を検出することができる。あるいは、正常遺伝子型との比較において本ポリヌクレオチドを公知の手法により増幅した増幅生成物について、例えばサイズ変化を測定することにより、欠失や挿入といった変異を検出可能である。また、被検試料から増幅したポリヌクレオチドを、例えば標識した本ポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定できる。かかる変化および変異の検出により、上記診断を実施することが可能である。

【0103】

本発明においては、被検試料中の本発明に係るポリヌクレオチドの定性的または定量的な測定方法、または該ポリヌクレオチドの特定領域における変異の定性的または定量的な測定方法をも提供可能である。

【0104】

配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの組織発現は、胃腫瘍の1つである胃腺癌様腫瘍で正常胃組織と比較して約5倍、4.5倍以上高いことが判明した。また、上述したように、該ポリヌクレオチドの高発現は胃腫瘍に関連すると考えられる。したがって、被検試料中の該ポリヌクレオチドの発現量の増加を検出することにより、該被検試料が胃腫瘍由来の被検試料であるか否かを判定する方法を実施することが可能である。このような判定方法も本発明の範囲に包含される。本判定方法において該ポリヌクレオチドの発現量の増加は、被検試料と正常な対照試料とを比較することにより検出できる。被検試料としては、好ましくはヒト胃組織由来の被検組織が挙げられる。対照試料としては、好ましくはヒト正常胃由来組織が挙げられる。該ポリヌクレオチドの発現量が対照試料と比較して増加している場合、好ましくは約4.5倍以上、より好ましくは約5倍以上に増加している場合、被検試料がヒト胃腫瘍由来試料であると判定することができる。本判定方法はまた、配列番号1に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドの代わ

りに、本ポリヌクレオチドを除く本発明に係るポリヌクレオチドを用いて実施できる。かかるポリヌクレオチドとして、例えば、配列番号3に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドを挙げることができる。本発明に係るポリヌクレオチドの発現量とは、該ポリヌクレオチドの転写産物の量を意味する。

【0105】

被検試料は、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む遺伝子またはその変異遺伝子の核酸を含む限りにおいて特に制限されず、例えば、細胞、血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等の生体生物由来の試料を例示できる。あるいは所望により試料から核酸を抽出して核酸試料を調製して用いることもできる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRまたはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。核酸試料は、また、標的配列の検出を容易にする種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットブロッキング等により調製してもよい。

【0106】

本発明に係るポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドを含む遺伝子の検出には、自体公知の遺伝子検出法がいずれも使用可能である。具体的には、ブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、サザンブロット法、ノザンブロット法、NASBA法、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)等が例示できる。また、*in situ* RT-PCRや*in situ* ハイブリダイゼーション等を利用した細胞レベルでの測定により検出可能である。このような遺伝子検出法においては、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む遺伝子またはその変異遺伝子の同定および／またはその増幅の実施に、本ポリヌクレオチドの部分配列からなるオリゴヌクレオチドであってプローブとしての性質を有するものまたはプライマーとしての性質を有するものが有用である。プローブとしての性質を有するオリゴヌクレオチドとは、本ポリヌクレオチドのみに特異的にハイブリダイゼーションできる該ポリヌクレオチド特有の配列からなるものを意味する。プライマーとしての性質を有するものとは本ポリヌクレオチドのみを特異的に増幅できる該ポリヌクレオチド特有の配列からなるものを意味する。また、増幅できる変異遺伝子を検出する場合には、遺伝子内の変異を有する箇所を含む所定の長さの配列を持つプライマーあるいはプローブを作成して用いる。プローブまたはプライマーとしては、塩基配列長が一般的に5乃至50ヌクレオチド程度であるものが好ましく、10乃至35ヌクレオチド程度であるものがより好ましく、15乃至30ヌクレオチド程度であるものがさらに好ましい。本発明に係るポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するためのプライマー、あるいは本ポリヌクレオチドを検出するためのプローブとして、具体的には、配列番号7、8、9または10に記載の塩基配列で表わされるオリゴヌクレオチドを好ましく例示できる。プローブは、通常は標識したプローブを用いるが、非標識であってもよい。また、直接的または間接的に標識したリガンドとの特異的結合により検出してもよい。プローブおよびリガンドを標識する方法は、種々の方法が知られており、例えばニックトランスレーション、ランダムプライミングまたはキナーゼ処理を利用する方法等を例示できる。適当な標識としては、放射性同位体、ビオチン、蛍光物質、化学発光物質、酵素、抗体等が挙げられる。

【0107】

遺伝子検出法としては、PCRが感度の点から好ましい。PCRは、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む遺伝子またはその変異遺伝子の特異的に増幅できるプライマーを用いる方法である限り、従来公知の方法のいずれも使用可能である。例えばRT-PCRが例示できるが、その他、当該分野で用いられる種々のPCRの変法を適応することができる。

【0108】

PCRにより、遺伝子の検出の他に、本発明に係るポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む遺伝子またはその変異遺伝子のDNAの定量も可能である。かかる分析方法としては、MSSA法等の競合的定量法、または一本鎖DNAの高次構造の変化に伴う移動

度の変化を利用した突然変異検出法として知られるPCR-SSCP法を例示できる。

【0109】

本発明によればまた、例えば本発明に係る蛋白質を利用することにより、個体若しくは各種組織における該蛋白質およびその機能の異常の有無を特異的に検出することができる。本発明に係る蛋白質およびその機能の異常の検出により、該蛋白質の量的異常および／または機能の異常に基づく疾患の易罹患性、発症、および／または予後の診断が可能である。

【0110】

蛋白質の検出による疾患の診断は、例えば被検試料について、該蛋白質の存在を検出すること、その存在量を決定すること、および／またはその変異を検出することにより実施できる。すなわち、本発明に係る蛋白質および／またはその変異体を定量的あるいは定性的に測定する。正常な対照試料との比較において、本蛋白質の存在の変化、その量的変化を検出することができる。正常蛋白質との比較において、例えばアミノ酸配列を決定することによりその変異を検出することができる。かかる変化および変異の検出により、上記診断を実施することが可能である。被検試料は、本蛋白質および／またはその変異体を含むものである限り特に制限されず、例えば、血液、血清、尿、生検組織等の生体生物由来の生物学的試料を例示できる。

【0111】

本発明に係る蛋白質および変異を有する該蛋白質の測定は、本発明に係る蛋白質、例えば配列表の配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列で表わされる蛋白質、または該蛋白質のアミノ酸配列において1若しくは数個乃至複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列で表わされる蛋白質、これらの断片、または該蛋白質やその断片に対する抗体を用いることにより可能である。

【0112】

蛋白質の定量的あるいは定性的な測定は、この分野における慣用技術による蛋白質検出法あるいは定量法を用いて行うことができる。例えば、本蛋白質のアミノ酸配列分析により変異蛋白質の検出ができるが、更に好ましくは、抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル抗体）を用いて、蛋白質の配列の相違、または蛋白質の有無を検出することができる。

【0113】

本発明においては、被検試料中の本蛋白質の定性的または定量的な測定方法、または該蛋白質の特定領域の変異の定性的または定量的な測定方法をも提供可能である。

【0114】

具体的には、被検試料について、本蛋白質に対する特異抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法またはイムノブロット法で本蛋白質の解析を行うことにより、上記検出が可能である。また、本蛋白質に対する抗体により、免疫組織化学的技術を用いてパラフィンまたは凍結組織切片中の本蛋白質を検出することができる。

【0115】

本蛋白質またはその変異体を検出する方法の好ましい具体例としては、モノクローナル抗体および／またはポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法を含む、酵素免疫測定法（ELISA）、放射線免疫検定法（RIA）、免疫放射線検定法（IRMA）、および免疫酵素法（IEMA）等が挙げられる。その他、ラジオイムノアッセイや競争結合アッセイ等を利用することもできる。

【0116】

本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、および抗体はいずれも、それ自体を単独であるいは組合わせて、試薬等として使用できる。試薬は、本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、および抗体のうちの少なくとも1種類の他に、緩衝液、塩、安定化剤、および／または防腐剤等の物質を含むことができる。なお、製剤化にあたっては、各性質に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。該試薬は、例えば、本発明に係る判定方法、化合物の同定方法、あるいは

本蛋白質または本ポリヌクレオチドの測定方法に使用することができる。該試薬はその他、本発明に係る蛋白質またはポリヌクレオチドが関与する細胞内情報伝達経路の解明、および該蛋白質またはポリヌクレオチドの異常に基づく疾患等に関する基礎的研究等に有用である。

【0117】

本発明はまた、本発明に係る蛋白質、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、および抗体のうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キットを提供する。試薬キットにはその他、本発明に係る蛋白質やポリヌクレオチドを検出するための標識物質、標識の検出剤、反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤および反応停止液等、測定の実施に必要とされる物質を含むことができる。標識物質としては、上述の蛋白質や放射性同位元素等が挙げられる。標識物質は、予め本発明に係る蛋白質あるいはポリヌクレオチドに付加されていてもよい。本試薬キットは、本発明に係る判定方法、化合物の同定方法、あるいは本蛋白質または本ポリヌクレオチドの測定方法に使用することができる。さらに、本試薬キットは、前記測定方法を用いる検査方法に、検査剤並びに検査用キットとして使用可能である。また、前記測定方法を用いる診断方法にも、診断剤並びに診断用キットとして使用可能である。

【0118】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。

【実施例1】

【0119】

(ヒト脳由来cDNAライブラリーの構築と遺伝子の分取)

ヒトの脳、胎児脳および脳海馬由来のpolyA⁺RNA (Clontech社製: カタログNo. 6516-1、6525-1および6578-1)を出発原料として常法によりcDNAライブラリーを構築し、dBEST分析によりcDNA断片を単離してcDNAクローンの塩基配列を決定した。具体的には、小原らの方法(非特許文献19)に従って調製した上記ヒト脳由来のcDNAライブラリーから、約50,000個の組換え体をランダムに選択し、このうち約30,000個のクローンのcDNAについて、その5'末端および3'末端の塩基配列を決定した。さらに約1,100個を主にインビトロの転写翻訳実験により選択し、それらcDNAの塩基配列を小原らの方法に従って決定した。

【0120】

全塩基配列の決定を行ったcDNAクローンについて、コンピュータプログラムを用いた汎用解析方法によりORFを予想した。次いで、ORF領域についてモチーフドメイン検索を行い、Rho-GEFの活性ドメインであるDH/PHドメインをコードする領域を含むcDNAを同定した。

【0121】

同定したcDNAクローンhj03796は、全長4977bpの新規な塩基配列を有するDNA(配列番号1)であり、1340アミノ酸(配列番号2)をコードするORFを含む。DHドメインは配列番号2に記載のアミノ酸配列の第97番目のバリン(Val)から第271番目のアスパラギン酸(Asp)までの175アミノ酸残基からなる。PHドメインは配列番号2に記載のアミノ酸配列の第297番目のロイシン(Leu)から第394番目のロイシン(Leu)までの98アミノ酸残基からなる。DHドメインおよびPHドメインをコードする領域はそれぞれ、配列番号1に記載の塩基配列の第602番目から第1126番目のヌクレオチドおよび第1202番目から第1495番目のヌクレオチドに相当する。

【実施例2】

【0122】

(DNAの発現と精製)

実施例1で同定したクローンhj03796を用いて、該クローンがコードする蛋白質をFLAG-tag融合蛋白質として293EBNA細胞(Invitrogen社製)

で発現させた。また、クローン h j 0 3 7 9 6 がコードする DH／PH ドメインについて、2 9 3 E B N A 細胞を用いて発現させた。発現の確認はウエスタンブロット法により行った。

【0 1 2 3】

まず、h j 0 3 7 9 6 遺伝子を含む発現ベクターを構築した。テンプレートとして p B l u e s c r i p t I I - h j 0 3 7 9 6 (h j 0 3 7 9 6 は p B l u e s c r i p t I I S K⁺ の S a l I - N o t I サイトに挿入されている；かずさ DNA 研究所製)、プライマーとして K 0 5 9 9 s 3 (配列番号 7) および a s B a m I (配列番号 8) を用いて p f u t u r b o (S t r a t a g e n e 社製) にて遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を H i n c I I / B a m H I で切断して得た遺伝子断片、p B l u e s c r i p t I I - h j 0 3 7 9 6 を S a l I / H i n c I I で切断した遺伝子断片、および p D s R e d 2 - N 1 (C l o n t e c h 社製) を S a l I / B a m H I で切断した遺伝子断片をライゲーションし、コンピテントセルに導入した。次いで、形質転換した大腸菌から精製キットを用いて DNA を精製した。精製 DNA を S a l I / B a m H I で切断することにより得られた h j 0 3 7 9 6 フラグメントを、ベクター DNA である p F L A G - C M V 5 b (S I G M A 社製) の S a l I / B a m H I サイトに挿入し、h j 0 3 7 9 6 発現ベクターを得た。制限酵素処理を行った塩基配列が正しく挿入されていることは、シーケンスを行なって確認した。シーケンス反応は DNA S e q u e n c i n g K i t (A B I 社製) を、泳動および解析は A B I P R I S M 3 7 7 を用いて行なった。

【0 1 2 4】

次に、h j 0 3 7 9 6 クローンがコードする全長蛋白質の部分配列からなる蛋白質であって DH／PH ドメインを含む蛋白質 (以下、h j 0 3 7 9 6 DH／PH と称する) を発現させるためのベクターを、ゲートウェイ T M クローニングテクノロジー (I n v i t r o g e n 社製) を用いて構築した。p B l u e s c r i p t I I - h j 0 3 7 9 6 をテンプレートとし、p f u t u r b o を用いて p r o t o - D b 1 の DH／PH ドメインコード領域と相同性のある領域 (配列番号 1 の第 5 8 1 番目から第 1 6 7 5 番目のヌクレオチドに相当) の 5' 末端にコザックシーケンスとメチオニンに対応するコドンとからなるオリゴヌクレオチド (配列番号 1 9) が付加されたポリヌクレオチドを増幅した。その後、増幅産物を T O P O クローニングシステムを用いた反応にて p E N T R / S D / D - T O P O に挿入し、エントリーベクターを作製した。増幅反応にはプライマーとして、0 3 7 9 6 D / P - F 1 (配列番号 9) および 0 3 7 9 6 D / P - R 3 (配列番号 1 0) を使用した。次いで、上記エントリーベクターと C 末端 F L A G - t a g (3 ×) 融合蛋白質発現ベクターを用いて、L R クロナーゼによる組換え反応により、h j 0 3 7 9 6 の DH／PH ドメインを F L A G - t a g (3 ×) 融合蛋白質として発現させるための発現ベクターを作製した。h j 0 3 7 9 6 の DH／PH コード領域の塩基配列が正しく挿入されていることは、シーケンスを行って確認した。シーケンス反応は D Y E n a m i c E T T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g K i t (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s 社製) を、泳動および解析は A B I P R I S M 3 7 7 を用いて行なった。

【0 1 2 5】

h j 0 3 7 9 6 DH／PH の比較対照として、既知 R h o - G E F である p r o t o - D b 1 の DH／PH ドメイン (以下、p r o t o - D b 1 DH／PH と称する) を用いるためにその発現ベクターを構築した。マルチプルティシュー c D N A パネルズ (M u l t i p l e T i s s u e c D N A P a n e l s、C l o n t e c h 社製) のブレインファーストストランド DNA (b r a i n f i r s t s t r a n d D N A) をテンプレートとし、p f u t u r b o を用いて p r o t o - D b 1 の DH／PH ドメインコード領域 (p r o t o - D b 1 の塩基配列中の第 1 4 8 5 番目から第 2 4 2 9 番目) を増幅した。その後、増幅産物をライゲーション反応にて p F L A G - C M V 5 a (S I G M A 社製) の B g l I I - S a l I サイトに挿入し、p r o t o - D b 1 の DH／PH ドメインを F L A G - t a g 融合蛋白質として発現させるための発現ベクターを作製した。

増幅反応にはプライマーとして、D/P-s1 (Bg11I) (配列番号11) および D/P-as1 (SalI) (配列番号12) を使用した。p r o t o - D b 1 の DH/P Hドメインコード領域の塩基配列が正しく挿入されていることをシーケンスにより確認したところ、1塩基が公開配列とは異なることが明らかになった。しかし、この1塩基の差異によるアミノ酸置換は認められなかった。具体的には、発現ベクターに挿入された p r o t o - D b 1 の公開配列 (アクセッション番号: X12556) と比較し、その公開配列の第1962番目の塩基であるT (チミン) がA (アデニン) となっている塩基配列である。発現ベクターに挿入された p r o t o - D b 1 の DH/P Hドメインコード領域は、p r o t o - D b 1 の公開配列の第1480番目から第2433番目までの塩基配列の5'末端にATGGCAが付加されている塩基配列である。したがって、発現ベクターに挿入された p r o t o - D b 1 の DH/P Hコード領域において、その開始ATGコドンより第489番目の塩基が公開配列の対応する塩基と異なっている。公開配列の第1960番目から第1962番目までの塩基はGGTであり、グリシンをコードしている。一方、発現ベクターに挿入された p r o t o - D b 1 の DH/P Hコード領域の塩基配列の第487番目から第489番目までの塩基はGGAであり、同様にグリシンをコードしている。すなわち、1塩基の差異によるアミノ酸置換は認められなかった。

【0126】

各発現ベクターは、293EBNA細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションした。すなわち、各発現ベクターを添加した無血清のDMEMとリポフェクトアミン2000 (LipofectAMINE 2000、Invitrogen社製) を添加したDMEMとを混合し、室温で20分間インキュベーションした。得られた混合液を、前日播種して37℃にて5%CO₂存在下で培養した293EBNA細胞に添加した。遺伝子導入処理した細胞は37℃にて5%CO₂存在下で2日間インキュベーションした。培養終了後、PBS-EDTAにて細胞を洗浄し、プロテアーゼインヒビターカクテル (protease inhibitor cocktail、1/100濃度、SIGMA社製) 1%を含む溶解バッファー (Lysis buffer) にて細胞を溶解して細胞溶解液を調製した。溶解バッファーは、次の組成からなる: 25mM Tris-HCl、pH7.5; 150mM NaCl; 1mM CaCl₂; および1% Triton X-100。

【0127】

各細胞溶解液は、等量のSDS-PAGEサンプルバッファーと混合し、加熱処理 (100℃で5分間) して電気泳動用サンプルを調製した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動ゲルをブロッキングバッファーに5分間以上浸して平衡化した後、PVDF膜上に蛋白質をトランスファーした。ブロッキング終了後のPVDF膜は、TBS-Tにブロックエース (大日本製薬株式会社製) を3:1の割合で混合した溶液 (TBS-T+BA) に4℃で一晩浸してブロッキングした。ブロッキング終了後に、PVDF膜をTBS-Tにて10分以上振とうしながら1回洗浄した。上記で用いたSDS-PAGEサンプルバッファーは、次の組成からなる: 1.7% Tris; 0.13M HCl; 22% グリセロール; 4.6% SDS; および0.22g/mL ブロモフェノールブルー。ブロッキングバッファーは、次の組成からなる: 25mM Tris; 40mM ε-アミノ-n-カプロン酸; 20% メタノール; および0.05% SDS。TBS-Tは、次の組成からなる: 150mM NaCl; 10mM Tris-HCl、pH7.5; および0.05% Tween-20。

【0128】

抗FLAG M2モノクローナル抗体 (1000倍希釈、SIGMA社製) をTBS-T+BAで希釈してPVDF膜に添加し、37℃で1時間以上保温した。その後、PVDF膜をTBS-Tにて3回洗浄し (1回の洗浄につき10分以上の振とう)、TBS-T+BAで1000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体 (Cell Signaling Technology社製) を添加して、37℃で1時間以上保温した。最終的に、PVDF膜をTBS-Tにて3回洗浄した後 (1回の洗浄につき10分以上の振とう

）、E C L プラスウエスタンブロッティングディテクションシステム（A m e r s h a m B i o s c i e n c e s 社製）により、抗F L A G 抗体に反応する発現蛋白質を検出した。化学発光シグナルは検出装置（L u m i n o I m a g i n g A n a l y z e r、東洋紡績株式会社製）にて可視化した。

【0129】

結果を図1に示す。F L A G - t a g 融合蛋白質として発現させたh j 0 3 7 9 6は、220KDaから97.4KDaの間に単一バンドとして検出された（図1内レーン1）。h j 0 3 7 9 6 D H / P Hは、抗F L A G 抗体により約50KDaに単一バンドとして検出された（図1内レーン4）。h j 0 3 7 9 6 がコードする蛋白質（以下、h j 0 3 7 9 6 蛋白質と称する）およびh j 0 3 7 9 6 D H / P Hの予想分子量はそれぞれ約150KDaおよび約43KDaである。このことから、上記単一バンドは、それぞれh j 0 3 7 9 6 およびh j 0 3 7 9 6 D H / P Hであることが明らかになった。また、p r o t o - D b 1 D H / P Hは、抗F L A G 抗体により約40KDaに単一バンドとして検出された（図1内レーン2およびレーン5）。

【0130】

かくして、h j 0 3 7 9 6 蛋白質、h j 0 3 7 9 6 D H / P H、およびp r o t o - D b 1 D H / P Hを得ることができた。

【実施例3】

【0131】

（R h o ファミリー蛋白質との結合の検出）

実施例2で構築したh j 0 3 7 9 6 D H / P H（C末端F L A G - t a g 融合蛋白質）発現ベクターを用いて、h j 0 3 7 9 6 D H / P HとR h o ファミリー蛋白質との結合について、プルダウン法により検討した。

【0132】

R h o ファミリー蛋白質としては、C d c 4 2、R h o AおよびR a c 1を用いた。これら蛋白質をN末端G S T - t a g 融合蛋白質として発現させるための発現ベクターは後述するように構築した。

【0133】

陽性コントロールとしてp r o t o - D b 1 D H / P Hを用いた。p r o t o - D b 1 D H / P H（C末端F L A G - t a g 融合蛋白質）発現ベクターは実施例2で構築した発現ベクターを用いた。p r o t o - D b 1はR h o - G E Fのプロトタイプであり、p r o t o - D b 1の活性化はo n c o g e n i c a c t i v a t i o nと考えられている。p r o t o - D b 1の活性化は、そのアミノ酸配列のN末端側（第1番目から第497番目のアミノ酸）の欠失により起こる。すなわち、p r o t o - D b 1のC末端側のD H / P Hドメインを含む領域（o n c o g e n i c - D b 1）がR h o ファミリー蛋白質を活性化することが報告されている（非特許文献1）。本実施例において用いたp r o t o - D b 1 D H / P Hはp r o t o - D b 1の第495番目から第809番目までのアミノ酸を有する欠失変異体であり、o n c o g e n i c - D b 1より短い配列である。o n c o g e n i c - D b 1は、C d c 4 2、R h o AおよびR a c 1と結合するが、C d c 4 2およびR h o Aに対してG E F活性を有する一方、R a c 1にはG E F活性を持たないことが報告されている（非特許文献2）。

【0134】

h j 0 3 7 9 6 D H / P Hまたはp r o t o - D b 1 D H / P Hに結合するR h o ファミリー蛋白質の特異性を確認するため、N末端側にG S T - t a gを付加したβ-グルクロニダーゼ（G l u c u r o n i d a s e）（以下、G S T - G U Sと略称する）を陰性コントロールとして用いた。

【0135】

h j 0 3 7 9 6 D H / P H発現ベクターまたはp r o t o - D b 1 D H / P H発現ベクターとR h o ファミリー蛋白質発現ベクターとを添加した無血清のD M E MとL i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0を添加したD M E Mを混合し、室温で20分間インキュベ

ションした。得られた混合液を293EBNA細胞に添加した。293EBNA細胞は、遺伝子導入の前日に細胞数 6.0×10^4 /wellを24ウェルプレートへ播種し、37℃にて5%CO₂存在下で一晩培養した後に本実施例で用いた。遺伝子導入処理した細胞は37℃にて5%CO₂存在下で2日間インキュベーションした。培養終了後、PBS-E D T Aにて細胞を洗浄し、プロテアーゼインヒビターカクテル (p r o t e a s e i n h i b i t o r c o c k t a i l、1/100濃度、S I G M A社製) 1%を含む溶解バッファー (組成は実施例2を参照) にて細胞を溶解して細胞溶解液を調製した。

【0136】

各細胞溶解液について、h j 0 3 7 9 6 D H / P H または p r o t o - D b 1 D H / P H と R h o ファミリー蛋白質との結合をブルダウン法により検出した。各細胞溶解液300μL、溶解バッファーにけん濁した20μLのグルタチオンセファロース4B (G l u t a t h i o n e s e p h a r o s e 4 B) および溶解バッファー100μLを混合した。各サンプルは、M g C l ₂ およびジチオスレイトール (D T T) がそれぞれ最終濃度1mMとなるように調整した。回転盤にて回転させながら4℃で1時間反応させた後に、1mLの冷却した溶解バッファー (M g C l ₂ の最終濃度1mM) を用いて遠心処理 (1,000rpmで4℃にて15秒間) により3回洗浄した。洗浄後に上清を除去したG l u t a t h i o n e s e p h a r o s e 4 B に、溶解バッファーと等量のS D S - P A G E サンプルバッファー (組成は実施例2を参照) を混合した溶液を40μL添加してミキサーにて攪拌後、加熱処理 (100℃にて5分間) して電気泳動用サンプルを調製した。S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ブロッティングバッファー (組成は実施例2を参照) に5分間以上浸して平衡化した泳動ゲルから、P V D F 膜上に蛋白質をトランスファーした。ブロッティング終了後のP V D F 膜は、T B S - T + B A (組成は実施例2を参照) に4℃で一晩浸してブロッキングした。ブロッキング終了後に、P V D F 膜をT B S - T (組成は実施例2を参照) にて洗浄した (10分以上の振とうを1回)。

【0137】

抗F L A G M 2モノクローナル抗体 (1000倍希釈、S I G M A社製) をT B S - T + B A で希釈してP V D F 膜に添加し、37℃で1時間以上保温した。その後、P V D F 膜をT B S - T にて3回洗浄し (1回の洗浄に付き10分以上の振とう)、T B S - T + B A で1000倍に希釈したH R P 標識抗マウスI g G 抗体 (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y 社製) を添加して、37℃で1時間以上保温した。最終的に、P V D F 膜をT B S - T にて3回洗浄した後 (1回の洗浄に付き10分以上の振とう)、E C L プラスウエスタンブロッティングディテクションシステム (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s 社製) により、抗F L A G 抗体に反応する発現蛋白質を検出した。化学発光シグナルは検出装置にて可視化した。

【0138】

抗F L A G 抗体にて予想分子量にバンドが検出された場合、h j 0 3 7 9 6 D H / P H または p r o t o - D b 1 D H / P H は R h o ファミリー蛋白質と結合すると判定した。図2に示したように、h j 0 3 7 9 6 D H / P H と R h o ファミリー蛋白質 (C d c 4 2、R h o A または R a c 1) とを共発現させた細胞から調製した試料ではそれぞれ約50KDaにh j 0 3 7 9 6 D H / P H に相当するバンドが検出された (図2の上図、h j 0 3 7 9 6 D H / P H のレーン1、2および3)。一方、p r o t o - D b 1 D H / P H と C d c 4 2 または R h o A とを共発現させた細胞から調製した試料では、p r o t o - D b 1 D H / P H に相当する約40KDa付近にバンドが検出された (図2の上図、p r o t o - D b 1 D H / P H のレーン2および3)。また、h j 0 3 7 9 6 D H / P H および p r o t o - D b 1 D H / P H はいずれもG S T - G U S とは結合しなかった (図2の上図、レーン4)。各細胞におけるh j 0 3 7 9 6 D H / P H および p r o t o - D b 1 D H / P H の発現量を細胞溶解液を用いて比較したところ、ほぼ同量であった (図2の下図)。

【0139】

これらから、h j 0 3 7 9 6 DH／PHがC d c 4 2、R h o AまたはR a c 1と結合することが判明した。したがって、h j 0 3 7 9 6 DH／PHを含むh j 0 3 7 9 6全長蛋白質は、これらR h oファミリー蛋白質と結合すると考えられ、さらにR h o－G E Fとしての機能を有する可能性がある。

【0140】

本実施例で用いたC d c 4 2、R h o AまたはR a c 1をN末端G S T－t a g融合蛋白質として発現させるための各発現ベクターは以下のように構築した。

C d c 4 2、R h o AまたはR a c 1の発現ベクターはゲートウェイTMクローニングテクノロジー（Invitrogen社製）を用いて作製した。まず、Multiple Tissue cDNA Panels（Clontech社製）のスプリーンファーストストランドDNA（spleen first strand DNA）をテンプレートとして、p f u t u r b oを用いてR h oファミリー蛋白質遺伝子（C d c 4 2、R h o AおよびR a c 1）を増幅した。増幅産物を、T O P O c l o n i n g s y s t e mを用いた反応にてp E N T R／Dに挿入してエントリーベクターを作製した。増幅反応にはプライマーとして、C d c 4 2遺伝子に対してはC d c 4 2－s 1（配列番号13）およびC d c 4 2－a s 1（配列番号14）、R h o A遺伝子に対してはR h o A－s 1（配列番号15）およびR h o A－a s 1（配列番号16）、R a c 1遺伝子に対してはR a c 1－s 1（配列番号17）およびR a c 1－a s 1（配列番号18）を使用した。次に、構築したエントリーベクターについて、N末端G S T－t a g融合蛋白質発現ベクターであるp D E S T 2 7を用いてL Rクロナーゼによる組換え反応よりG S T融合R h o発現プラスミドを作製した。各遺伝子のコード領域の塩基配列が正しく挿入されていることをシーケンスを行って確認した。シーケンス反応はD Y E n a m i c E T T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g K i t（Amersham Biosciences社製）を、泳動および解析はA B I P R I S M 3 7 7を用いて行なった。

【実施例4】

【0141】

（h j 0 3 7 9 6 DH／PHによるC d c 4 2の活性化促進）

h j 0 3 7 9 6 DH／PHのR h oファミリー蛋白質に対するG E F活性を、実施例2で構築したh j 0 3 7 9 6 DH／PH（C末端F L A G－t a g融合蛋白質）発現ベクターを用いて、エフェクターブルダウン法により検討した。R h oファミリー蛋白質としては、C d c 4 2、R h o AおよびR a c 1を用いた。これらR h oファミリー蛋白質はいずれもN末端3×F L A G－t a g融合蛋白質として発現させた。

【0142】

h j 0 3 7 9 6 DH／PH（C末端F L A G－t a g融合蛋白質）発現ベクターと上記いずれかのR h oファミリー蛋白質を発現させるための発現ベクターとを、24ウエルプレートに播種した293EBNA細胞に導入した。ベクターの細胞への導入は、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0を用いて行った。陰性コントロールとして、細胞に各ベクターを導入せずに、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0のみを添加したものを用いた。遺伝子導入1日後、プロテアーゼインヒビターカクテル（1／100濃度：S I G M A社製）を含む溶解バッファーで細胞を溶解して細胞溶解液を調製した。次いで、細胞溶解液をエフェクターベッド（U P S T A T E社製）と4℃で1時間反応させた。エフェクターベッドとしては、P A K－1またはR h o t e k i nの、活性型R h oファミリー蛋白質に結合するドメインにG S T－t a gを付加した蛋白質が結合しているグルタチオンアガロースを用いた。反応させたエフェクターベッドは、溶解バッファーで洗浄し、溶出液（トリス・S D S・βメルカプトエタノール処理液：株式会社第一化学社製）で溶出操作を行った。得られた溶出液は、S D S－P A G Eによりウエスタンブロッティングに付し、その後、抗F L A G抗体を用いてF L A G－t a g付加蛋白質の検出を実施した。溶解バッファーは次の組成からなる：25mM H E P E S、p H 7.5；150mM N a C l；10mM M g C l 2；1mM E D T A；2% グリセロール；1% T r i t o n

X-100。

【0143】

h j 0 3 7 9 6 DH/PHがR h oファミリー蛋白質に対してG E F活性を有するならば、h j 0 3 7 9 6 DH/PHによりR h oファミリー蛋白質は不活性型（G D P結合型）から活性型（G T P結合型）に移行する。エフェクターベッドとして使用したP A K-1は活性型C d c 4 2および活性型R a c 1と結合することが知られている。また、R h o t e k i nは活性型R h o Aと結合する。したがって、h j 0 3 7 9 6 DH/PHがR h oファミリー蛋白質に対してG E F活性を有するならば、エフェクターベッドに結合するR h oファミリー蛋白質量が増加する。抗F L A G抗体により、h j 0 3 7 9 6 DH/PHおよびR h oファミリー蛋白質を共発現させた細胞から得た試料が、R h oファミリー蛋白質のみを発現させた細胞から得た試料よりもR h oファミリー蛋白質のバンドが濃く検出される場合、h j 0 3 7 9 6 DH/PHはG E F活性を有すると判定した。

【0144】

結果を図3-Aおよび図3-Bに示す。図3-Aは、各細胞溶解液に含まれるR h oファミリー蛋白質の発現を、抗F L A G抗体により検出した結果を示す。それぞれのR h oファミリー蛋白質の発現は、h j 0 3 7 9 6 DH/PHと共発現させた細胞およびR h oファミリー蛋白質のみを発現させた細胞のいずれにおいても、ほぼ同等であった（図3-Aのレーン2、4、6、8、10および12）。R h o Aについては複数のバンドが確認された（図3-Aのレーン6および8）。これは、蛋白質分解酵素による影響であると考えた。h j 0 3 7 9 6 DH/PHについては、h j 0 3 7 9 6 DH/PHのみを発現させた細胞および各R h oファミリー蛋白質と共発現させた細胞のいずれにおいても、ほぼ同等の発現が認められた（図3-Aのレーン3、4、7、8、11および12）。

【0145】

図3-Bは、上記各細胞溶解液を用いてエフェクタープルダウン法を実施した結果を示す。C d c 4 2とh j 0 3 7 9 6 DH/PHを共発現させた細胞から得た試料（図3-Bのレーン4）において、R h oファミリー蛋白質のみを発現させた細胞から得た試料（図3-Bのレーン2）と比較して、バンドが濃く検出された。すなわち、C d c 4 2とh j 0 3 7 9 6 DH/PHを共発現させた細胞では、P A K-1に結合する活性型C d c 4 2が増加した。このことから、h j 0 3 7 9 6 DH/PHは、C d c 4 2に対してG E F活性を有することが明らかになった。よって、h j 0 3 7 9 6 DH/PHを含むh j 0 3 7 9 6全長蛋白質もC d c 4 2に対してG E F活性を有すると考える。このように、h j 0 3 7 9 6は、C d c 4 2の活性化を促進する機能を有することが判明した。

【産業上の利用可能性】

【0146】

本発明に係るポリヌクレオチドがコードする蛋白質はR h oファミリー蛋白質と結合し、さらにR h oファミリー蛋白質の活性化を促進した。本蛋白質およびポリヌクレオチドの利用により、R h oファミリー蛋白質が関与する情報伝達経路および細胞機能の解明とその調節、並びに本蛋白質またはポリヌクレオチドの異常に基づく疾患、例えば胃腫瘍の診断、防止および／または治療が可能になる。したがって、本発明は基礎科学分野から医薬開発分野まで広く寄与する有用な発明である。

【図面の簡単な説明】

【0147】

【図1】 c D N Aクローンh j 0 3 7 9 6または該c D N Aの部分配列からなるD N AであってD H/PHドメインコード領域を含むD N Aを用いて構築したベクターを導入した細胞の細胞溶解液において、h j 0 3 7 9 6がコードする蛋白質または該蛋白質のD H/PHドメインを含む蛋白質断片（h j 0 3 7 9 6 DH/PH）を示すバンドが、ウェスタンブロッティング法により検出されたこと（それぞれレーン1および4）を説明する図である。p r o t o-D b 1 DH/PHは陽性コントロールとして用いた（レーン2および5）。ベクターを導入しなかったコントロール細胞から同様の処理により得た蛋白質溶液では、かかるバンドは検出されなかった（レーン3お

よび6)。(実施例2)

【図2】cDNAクローンh j 0 3 7 9 6の部分配列からなるDNAであってDH／PHドメインコード領域を含むDNA(h j 0 3 7 9 6 DH／PH)と、R a c 1 遺伝子(レーン1)、R h o A 遺伝子(レーン2)またはC d c 4 2 遺伝子(レーン3)とを共発現させた細胞の細胞溶解液において、h j 0 3 7 9 6 DH／PHがコードする蛋白質とR a c 1 (レーン1)、R h o A (レーン2)およびC d c 4 2 (レーン3)との結合を示すバンドが検出されたことを説明する図である(上図)。結合の測定はブルダウン法により行った。陰性コントロールとしてR h o ファミリー蛋白質の代わりにG S T - t a g 融合β-グルクロニダーゼを用いたとき、あるいはR h o ファミリー蛋白質遺伝子を発現させなかったときにはかかるバンドは認められなかった(それぞれレーン4および5)。p r o t o - D b 1 DH／PHは陽性コントロールとして用いた。各細胞溶解液において、h j 0 3 7 9 6 DH／PHまたはp r o t o - D b 1 DH／PHの発現量はほぼ同等であった(下図)。(実施例3)

【図3-A】h j 0 3 7 9 6 DH／PHとR h o ファミリー蛋白質を共発現させた細胞、およびh j 0 3 7 9 6 DH／PHまたはR h o ファミリー蛋白質を発現させた細胞のいずれにおいても、h j 0 3 7 9 6 DHまたはR h o ファミリー蛋白質の発現がほぼ同等であったことを示す図である。図中G E F とはh j 0 3 7 9 6 DH／PHを意味し、R h o とはR h o ファミリー蛋白質を意味する。また、黒矢頭はh j 0 3 7 9 6 DH／PHを、白矢頭はR h o ファミリー蛋白質を示す。(実施例4)

【図3-B】h j 0 3 7 9 6 DH／PHとC d c 4 2 を共発現させた細胞で、C d c 4 2 のみを発現させた細胞と比較して、P A K - 1 に結合する活性型C d c 4 2 が増加したことを示す図である(レーン4)。図中G E F とはh j 0 3 7 9 6 DH／PHを意味し、R h o とはR h o ファミリー蛋白質を意味する。また、白矢頭はR h o ファミリー蛋白質を示す。(実施例4)

【配列表フリーテキスト】

【0148】

配列番号1：(602)：(1126) D b 1 相同ドメインをコードする領域。

配列番号1：(1202)：(1495) プレックストリン相同ドメインをコードする領域。

配列番号3：配列番号1の第581番目から第1675番目までのヌクレオチドからなる部分配列であり、D b 1 相同ドメインおよびプレックストリン相同ドメインをコードする領域を含む配列からなるポリヌクレオチド。

配列番号5：5'末端にコザックコンセンサス配列とメチオニンをコードする配列を有し、それに続いて、配列番号1の第581番目から第1675番目までのヌクレオチドからなる部分配列であり、D b 1 相同ドメインおよびプレックストリン相同ドメインをコードする領域を含む配列を有するポリヌクレオチド。

配列番号7：プライマー用に配列番号1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号8：プライマー用に配列番号1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号9：プライマー用に配列番号1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号10：プライマー用に配列番号1の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号11：プライマー用にp r o t o - D b 1 の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号12：プライマー用にp r o t o - D b 1 の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号13：プライマー用にC d c 4 2 の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号14：プライマー用にC d c 4 2 の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号15：プライマー用にR h o A の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。

配列番号 16 : プライマー用に R h o A の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。
配列番号 17 : プライマー用に R a c 1 の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。
配列番号 18 : プライマー用に R a c 1 の配列に基づいて設計されたポリヌクレオチド。
配列番号 19 : コザックコンセンサス配列とそれに続くメチオニンに対応するコドンを含む設計されたオリゴヌクレオチド。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE FOUNDATION

<120> A gene coding for guanine nucleotide exchange factor and the gene product of the same

<130> NP03-1119

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4977

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (314)..(4336)

<223>

<220>

<221> misc-feature

<222> (602)..(1126)

<223> A region coding for Dbl homology domain

<220>

<221> misc-feature

<222> (1202)..(1495)

<223> A region coding for Pleckstrin homology domain

<400> 1

c g e t c c c t c g c t c c c t c c t g c c c t c c c g c t g c a g e t c c g g c t c c g c t e g a c t t c c t g c c g 60

g g c g c t g g c a a g c c g c g c g c t g c c t g g g g t c t c c g g g g g c c g c g c t t g c a g c t g g c c g a g 120

t c c g g g c c a g c t g a g g g g c t g g c g g t g g g c g g g a g c g g t c g g c g g c c t c a g c c c c t t c a g 180

a g a g c g a c t t t c a a a c t c g c g c c c g c g t c g c g g c a g c a c c t g g g c a g c c c c g c a c g c c g t 240

g c g c g t c c c g a g c c c g c g g g g c a g e t a c c g c t e g a a t c t c c c t g g g g t g c c c t c c c c a g g 300

c a g c a a t g c c a g g a t g c c t g t g t c c a c c t c c c t c c a c c a g g a t g g c a g c 349

Met Pro Val Ser Thr Ser Leu His Gln Asp Gly Ser

	1		5		10	
cag gag cgg ccg gtg agc ctg acc tct acc acc tcc tcg tcg ggc tcc						397
Gln Glu Arg Pro Val Ser Leu Thr Ser Thr Thr Ser Ser Ser Gly Ser						
	15		20		25	
tcc tgt gac agt cgc agt gcc atg gag gag ccc agc agc tcc gag gct						445
Ser Cys Asp Ser Arg Ser Ala Met Glu Glu Pro Ser Ser Ser Glu Ala						
	30		35		40	
ccc gcc aag aat ggg gca ggc tcc ctg aga agc cgg cat ctg ccc aac						493
Pro Ala Lys Asn Gly Ala Gly Ser Leu Arg Ser Arg His Leu Pro Asn						
	45		50		55	60
agc aac aac aac tcc agc agc tgg ttg aac gtg aag ggg ccc ctc tcc						541
Ser Asn Asn Asn Ser Ser Ser Trp Leu Asn Val Lys Gly Pro Leu Ser						
		65		70		75
ccg ttc aac agc cgg gca gcg gca ggg cct gca cac cac aag ctc agc						589
Pro Phe Asn Ser Arg Ala Ala Ala Gly Pro Ala His His Lys Leu Ser						
	80		85		90	
tac ctg ggc cga gtg gtg cgg gag atc gtg gag aca gag cgc atg tac						637
Tyr Leu Gly Arg Val Val Arg Glu Ile Val Glu Thr Glu Arg Met Tyr						
	95		100		105	
gta cag gac ctg cgc agc atc gtg gag gac tac ctc ttg aag atc att						685
Val Gln Asp Leu Arg Ser Ile Val Glu Asp Tyr Leu Leu Lys Ile Ile						
	110		115		120	
gac aca ccc ggg ctg ctg aag cca gaa cag gtc agc gcc ctc ttt ggg						733
Asp Thr Pro Gly Leu Leu Lys Pro Glu Gln Val Ser Ala Leu Phe Gly						
	125		130		135	140
aac ata gaa aac atc tac gcg ctg aac agc cag ctc ctc aga gac ctg						781
Asn Ile Glu Asn Ile Tyr Ala Leu Asn Ser Gln Leu Leu Arg Asp Leu						
		145		150		155
gac agc tgc aat agt gac ccc gtg gct gtg gcc agc tgc ttt gtg gaa						829
Asp Ser Cys Asn Ser Asp Pro Val Ala Val Ala Ser Cys Phe Val Glu						
	160		165		170	
agg agc caa gag ttt gat atc tac act cag tat tgc aac aat tac ccc						877
Arg Ser Gln Glu Phe Asp Ile Tyr Thr Gln Tyr Cys Asn Asn Tyr Pro						
	175		180		185	
aac tcc gtg gcc gcc ctg acg gaa tgc atg cgg gac aag cag cag gcc						925
Asn Ser Val Ala Ala Leu Thr Glu Cys Met Arg Asp Lys Gln Gln Ala						
	190		195		200	

aag	ttc	ttt	cgg	gac	cgg	cag	gag	ctg	cta	cag	cac	tcg	ctg	ccc	ttg	973
Lys	Phe	Phe	Arg	Asp	Arg	Gln	Glu	Leu	Leu	Gln	His	Ser	Leu	Pro	Leu	
205					210					215					220	
ggc	tcc	tac	ctg	ctg	aag	cca	gtc	cag	cgc	atc	ctc	aag	tac	cac	ctg	1021
Gly	Ser	Tyr	Leu	Leu	Lys	Pro	Val	Gln	Arg	Ile	Leu	Lys	Tyr	His	Leu	
			225					230						235		
ctg	ctc	cag	gaa	att	gcc	aaa	cat	ttt	gat	gaa	gaa	gag	gat	ggc	ttt	1069
Leu	Leu	Gln	Glu	Ile	Ala	Lys	His	Phe	Asp	Glu	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	
		240						245					250			
gag	gtg	gtg	gag	gat	gcc	att	gac	acc	atg	acc	tgt	gtg	gcc	tgg	tac	1117
Glu	Val	Val	Glu	Asp	Ala	Ile	Asp	Thr	Met	Thr	Cys	Val	Ala	Trp	Tyr	
		255					260					265				
atc	aac	gac	atg	aag	agg	agg	cat	gag	cac	gcg	gtc	cgg	ctc	cag	gag	1165
Ile	Asn	Asp	Met	Lys	Arg	Arg	His	Glu	His	Ala	Val	Arg	Leu	Gln	Glu	
	270					275					280					
att	cag	tca	ctc	ctc	atc	aac	tgg	aag	ggg	ccc	gac	ctg	acc	acc	tac	1213
Ile	Gln	Ser	Leu	Leu	Ile	Asn	Trp	Lys	Gly	Pro	Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	
285					290					295					300	
ggg	gag	ctt	gtc	ctg	gag	ggc	aca	ttc	cgc	gtg	cat	cgc	gtg	cgc	aat	1261
Gly	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	Val	His	Arg	Val	Arg	Asn	
			305					310						315		
gaa	agg	acc	ttt	ttc	ctc	ttt	gac	aaa	aca	ctg	ctt	atc	acc	aag	aag	1309
Glu	Arg	Thr	Phe	Phe	Leu	Phe	Asp	Lys	Thr	Leu	Leu	Ile	Thr	Lys	Lys	
			320					325					330			
cgg	ggc	gat	cac	ttt	gtc	tac	aag	ggc	aac	atc	cgg	tgc	tcc	tcc	ctg	1357
Arg	Gly	Asp	His	Phe	Val	Tyr	Lys	Gly	Asn	Ile	Pro	Cys	Ser	Ser	Leu	
		335					340					345				
atg	ctg	atc	gaa	agc	acc	aga	gac	tcc	ctg	tgc	ttc	act	gtc	acc	cac	1405
Met	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	Arg	Asp	Ser	Leu	Cys	Phe	Thr	Val	Thr	His	
	350					355					360					
tac	aag	cac	agc	aag	cag	cag	tac	agc	atc	cag	gcc	aag	aca	gtg	gag	1453
Tyr	Lys	His	Ser	Lys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Lys	Thr	Val	Glu	
365					370					375					380	
gag	aaa	cgg	aac	tgg	act	cac	cac	atc	aag	agg	ctc	atc	cta	gag	aac	1501
Glu	Lys	Arg	Asn	Trp	Thr	His	His	Ile	Lys	Arg	Leu	Ile	Leu	Glu	Asn	
			385					390						395		
cac	cat	gcc	acc	att	ccc	cag	aag	gcc	aag	gaa	gcc	atc	ttg	gaa	atg	1549
His	His	Ala	Thr	Ile	Pro	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Ala	Ile	Leu	Glu	Met	

400							405							410						
gat	tcc	tat	tat	ccc	aat	cgg	tac	cgc	tgc	agc	cca	gag	cgg	ctg	aag	1597				
Asp	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Arg	Tyr	Arg	Cys	Ser	Pro	Glu	Arg	Leu	Lys					
415								420				425								
aag	gct	tgg	tcc	tcc	cag	gat	gag	gtg	tcc	acc	aat	gtg	cgc	cag	ggg	1645				
Lys	Ala	Trp	Ser	Ser	Gln	Asp	Glu	Val	Ser	Thr	Asn	Val	Arg	Gln	Gly					
430								435				440								
cgc	cgg	caa	tct	gag	cca	acc	aaa	cac	ctg	ctc	agg	caa	ctc	aac	gag	1693				
Arg	Arg	Gln	Ser	Glu	Pro	Thr	Lys	His	Leu	Leu	Arg	Gln	Leu	Asn	Glu					
445				450				455				460								
aaa	gcc	cga	gca	gca	gga	atg	aag	cat	gca	ggc	agt	gct	gga	acc	ctc	1741				
Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Gly	Met	Lys	His	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Thr	Leu					
				465				470				475								
ctg	gac	ttt	ggg	cag	ccc	tcc	cgt	act	cgg	ggc	ctg	cag	cca	gag	gct	1789				
Leu	Asp	Phe	Gly	Gln	Pro	Ser	Arg	Thr	Arg	Gly	Leu	Gln	Pro	Glu	Ala					
				480				485				490								
gaa	ggg	gct	acc	cag	gag	gag	gaa	gag	gaa	gag	gag	gag	gtg	gtg	gag	1837				
Glu	Gly	Ala	Thr	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Val	Glu					
495								500				505								
gag	gag	gag	gag	gag	gag	gag	gaa	gag	cag	gcc	ttt	cag	gtc	tct	ctg	1885				
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gln	Ala	Phe	Gln	Val	Ser	Leu					
510								515				520								
gag	gac	ctg	aca	ggg	cat	gaa	ggc	aac	gag	aag	ggg	gct	ggg	ccg	gag	1933				
Glu	Asp	Leu	Thr	Gly	His	Glu	Gly	Asn	Glu	Lys	Gly	Ala	Gly	Pro	Glu					
525				530								535				540				
ccc	cca	ggc	tca	gag	gag	gag	gag	gag	gag	cag	gag	gag	agc	ctg	gcg	1981				
Pro	Pro	Gly	Ser	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gln	Glu	Glu	Ser	Leu	Ala					
				545				550				555								
gtg	gcg	gag	cag	gta	gcc	gac	ttt	gcc	agc	tcc	ctg	ctg	gcc	gcc	ctc	2029				
Val	Ala	Glu	Gln	Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Ser	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu					
				560				565				570								
cac	tgc	tgg	cac	tat	cgg	gcc	aac	gct	tta	ctt	ttc	tcc	cgg	ggc	gct	2077				
His	Cys	Trp	His	Tyr	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Phe	Ser	Arg	Gly	Ala					
575								580				585								
atg	gga	aag	ggg	cgc	agg	gag	tct	gaa	agc	tcc	agg	agc	agc	aga	agg	2125				
Met	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg	Glu	Ser	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Arg	Arg					
590								595				600								

ccc agt ggc cgg tct cca acc agt act gag aag cgc atg agc ttc gag	2173
Pro Ser Gly Arg Ser Pro Thr Ser Thr Glu Lys Arg Met Ser Phe Glu	
605 610 615 620	
tcc att tct tcc ctg cca gag gtt gag ccg gac cct gag gct ggg agt	2221
Ser Ile Ser Ser Leu Pro Glu Val Glu Pro Asp Pro Glu Ala Gly Ser	
625 630 635	
gag caa gag gta ttt tct gct gtg gaa ggg ccc agt gcc gag gag acg	2269
Glu Gln Glu Val Phe Ser Ala Val Glu Gly Pro Ser Ala Glu Glu Thr	
640 645 650	
cct tca gac aca gaa tct cca gaa gtc ctg gag aca cag ctt gat gcc	2317
Pro Ser Asp Thr Glu Ser Pro Glu Val Leu Glu Thr Gln Leu Asp Ala	
655 660 665	
cac cag ggc ctt ctg ggg atg gac ccc cca ggt gac atg gtg gac ttc	2365
His Gln Gly Leu Leu Gly Met Asp Pro Pro Gly Asp Met Val Asp Phe	
670 675 680	
gtg gca gct gag agc act gag gac ctt aag gcc ctg agc agc gag gag	2413
Val Ala Ala Glu Ser Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Ser Glu Glu	
685 690 695 700	
gaa gaa gaa atg gga ggt gcc gcc cag gag cct gag agc ctt ctg cca	2461
Glu Glu Glu Met Gly Gly Ala Ala Gln Glu Pro Glu Ser Leu Leu Pro	
705 710 715	
ccc tcc gtg ctg gac cag gcc agc gtc att gcg gag cga ttt gtc agc	2509
Pro Ser Val Leu Asp Gln Ala Ser Val Ile Ala Glu Arg Phe Val Ser	
720 725 730	
agc ttc tct cgg cgg agc agc gtg gca cag gag gac agc aag tcc agt	2557
Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Val Ala Gln Glu Asp Ser Lys Ser Ser	
735 740 745	
ggc ttt ggg agc ccg cgg ctg gtc agc cgg agc agc agc gtg ctc agc	2605
Gly Phe Gly Ser Pro Arg Leu Val Ser Arg Ser Ser Ser Val Leu Ser	
750 755 760	
ctg gag ggc agc gag aag ggc ctg gcc ccg cat ggc agt gcc aca gac	2653
Leu Glu Gly Ser Glu Lys Gly Leu Ala Arg His Gly Ser Ala Thr Asp	
765 770 775 780	
tcc ctc agc tgt cag ctc tcc cca gaa gtg gac atc agt gtg ggg gtg	2701
Ser Leu Ser Cys Gln Leu Ser Pro Glu Val Asp Ile Ser Val Gly Val	
785 790 795	
gcc aca gag gac agc cct tct gtc aat ggg atg gag ccc cca agc cca	2749
Ala Thr Glu Asp Ser Pro Ser Val Asn Gly Met Glu Pro Pro Ser Pro	

			800				805				810							
ggc	tgc	cca	gtg	gag	cct	gac	cgg	tct	tcc	tgc	aag	aag	aag	gaa	tca		2797	
Gly	Cys	Pro	Val	Glu	Pro	Asp	Arg	Ser	Ser	Cys	Lys	Lys	Lys	Glu	Ser			
			815					820					825					
gca	ctc	tcc	acc	cga	gac	cgg	ctg	ttg	cta	gac	aag	att	aag	agc	tat		2845	
Ala	Leu	Ser	Thr	Arg	Asp	Arg	Leu	Leu	Leu	Asp	Lys	Ile	Lys	Ser	Tyr			
			830					835					840					
tat	gaa	aat	gca	gaa	cac	cat	gat	gca	ggc	ttc	agc	gtc	cggt	cgc	cgg		2893	
Tyr	Glu	Asn	Ala	Glu	His	His	Asp	Ala	Gly	Phe	Ser	Val	Arg	Arg	Arg			
845						850					855					860		
gag	agc	ctc	tcc	tac	atc	ccc	aaa	gga	ctg	gta	aga	aac	tcc	atc	tcc		2941	
Glu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Ile	Pro	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Asn	Ser	Ile	Ser			
			865					870					875					
agg	ttc	aac	agc	ctt	ccc	cgg	cca	gac	cca	gag	cca	gta	cct	cca	gtg		2989	
Arg	Phe	Asn	Ser	Leu	Pro	Arg	Pro	Asp	Pro	Glu	Pro	Val	Pro	Pro	Val			
			880					885					890					
ggg	agc	aag	aga	cag	gtg	ggc	tcc	cgg	ccg	act	tcg	tgg	gcc	ctg	ttt		3037	
Gly	Ser	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Ser	Trp	Ala	Leu	Phe			
			895					900					905					
gag	ctc	cca	gga	cca	agc	cag	gca	gtc	aaa	ggg	gac	cca	cct	ccc	atc		3085	
Glu	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Gln	Ala	Val	Lys	Gly	Asp	Pro	Pro	Pro	Ile			
			910					915					920					
tca	gat	gct	gag	ttc	cgc	cca	tct	tca	gaa	att	gtg	aag	atc	tgg	gag		3133	
Ser	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	Pro	Ser	Ser	Glu	Ile	Val	Lys	Ile	Trp	Glu			
925						930					935					940		
gga	atg	gag	tct	tcc	gga	ggg	agc	cct	ggg	aag	ggg	cca	ggc	cag	ggc		3181	
Gly	Met	Glu	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	Gly	Gln	Gly			
			945					950					955					
cag	gcc	aat	ggc	ttt	gac	ctg	cat	gag	cca	ctc	ttc	atc	ctg	gag	gag		3229	
Gln	Ala	Asn	Gly	Phe	Asp	Leu	His	Glu	Pro	Leu	Phe	Ile	Leu	Glu	Glu			
			960					965					970					
cat	gag	ctg	gga	gcc	atc	aca	gag	gag	tcg	gcc	act	gcc	tcc	ccg	gaa		3277	
His	Glu	Leu	Gly	Ala	Ile	Thr	Glu	Glu	Ser	Ala	Thr	Ala	Ser	Pro	Glu			
			975					980					985					
agc	tcc	tct	ccc	act	gag	ggg	cgc	agc	ccg	gcc	cac	ctg	gcc	cgg	gag		3325	
Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	Glu	Gly	Arg	Ser	Pro	Ala	His	Leu	Ala	Arg	Glu			
			990					995					1000					

ctg	aaa	gag	ctg	gtg	aag	gag	ctg	agc	agc	agt	acc	cag	ggg	gag	3370
Leu	Lys	Glu	Leu	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Gly	Glu	
1005					1010					1015					
ctg	gtg	gcc	cca	ctg	cac	ccc	cgc	atc	gtg	cag	ctc	tcc	cac	gta	3415
Leu	Val	Ala	Pro	Leu	His	Pro	Arg	Ile	Val	Gln	Leu	Ser	His	Val	
1020					1025					1030					
atg	gac	agc	cac	gtg	agc	gag	cgc	gtc	aag	aac	aag	gtc	tac	cag	3460
Met	Asp	Ser	His	Val	Ser	Glu	Arg	Val	Lys	Asn	Lys	Val	Tyr	Gln	
1035					1040					1045					
ctg	gcc	cgc	cag	tac	agc	ctc	cgg	atc	aag	agc	aac	aag	cca	gtg	3505
Leu	Ala	Arg	Gln	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ile	Lys	Ser	Asn	Lys	Pro	Val	
1050					1055					1060					
atg	gcc	agg	cca	cca	ctg	cag	tgg	gaa	aag	gtg	gcc	cct	gag	agg	3550
Met	Ala	Arg	Pro	Pro	Leu	Gln	Trp	Glu	Lys	Val	Ala	Pro	Glu	Arg	
1065					1070					1075					
gat	ggg	aag	agc	ccc	act	gtg	ccc	tgt	cta	cag	gaa	gag	gct	gga	3595
Asp	Gly	Lys	Ser	Pro	Thr	Val	Pro	Cys	Leu	Gln	Glu	Glu	Ala	Gly	
1080					1085					1090					
gag	cca	tta	ggt	ggc	aaa	ggt	aag	agg	aag	ccg	gtg	ctg	tct	cta	3640
Glu	Pro	Leu	Gly	Gly	Lys	Gly	Lys	Arg	Lys	Pro	Val	Leu	Ser	Leu	
1095					1100					1105					
ttt	gac	tat	gag	cag	ctg	atg	gcc	cag	gag	cac	agc	cct	ccc	aag	3685
Phe	Asp	Tyr	Glu	Gln	Leu	Met	Ala	Gln	Glu	His	Ser	Pro	Pro	Lys	
1110					1115					1120					
ccc	tcc	tcg	gct	ggg	gag	atg	tca	cca	cag	cgt	ttc	ttc	ttc	aac	3730
Pro	Ser	Ser	Ala	Gly	Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	
1125					1130					1135					
ccg	tct	gct	gtc	agc	cag	agg	acc	acc	tcg	cct	ggg	ggc	cgg	ccc	3775
Pro	Ser	Ala	Val	Ser	Gln	Arg	Thr	Thr	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Pro	
1140					1145					1150					
tcc	gcc	tgg	agc	ccc	ctc	agc	ccc	aca	gag	acc	ttc	agc	tgg	ccc	3820
Ser	Ala	Trp	Ser	Pro	Leu	Ser	Pro	Thr	Glu	Thr	Phe	Ser	Trp	Pro	
1155					1160					1165					
gac	gtc	cgt	gag	ctc	tgc	tcc	aag	tat	gcc	tcc	cgc	gat	gag	gca	3865
Asp	Val	Arg	Glu	Leu	Cys	Ser	Lys	Tyr	Ala	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	
1170					1175					1180					
cgc	cga	gca	ggg	ggc	ggc	cgg	ccc	cgc	ggc	cca	ccc	gtc	aac	agg	3910
Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Gly	Arg	Pro	Arg	Gly	Pro	Pro	Val	Asn	Arg	

1185		1190		1195	
agc cac tcg gtg ccg gag aac atg gta gag cca cct ctg tcg ggc	3955				
Ser His Ser Val Pro Glu Asn Met Val Glu Pro Pro Leu Ser Gly					
1200	1205	1210			
agg gtg ggc cgc tgc cgc agc ctg agc acc aag agg ggc cgg gga	4000				
Arg Val Gly Arg Cys Arg Ser Leu Ser Thr Lys Arg Gly Arg Gly					
1215	1220	1225			
ggc gga gag gct gcc caa tcc cct ggg cct ctg ccc cag agc aag	4045				
Gly Gly Glu Ala Ala Gln Ser Pro Gly Pro Leu Pro Gln Ser Lys					
1230	1235	1240			
ccg gat gga ggc gag acc ctg tat gtc act gca gac ctc acc ctg	4090				
Pro Asp Gly Gly Glu Thr Leu Tyr Val Thr Ala Asp Leu Thr Leu					
1245	1250	1255			
gag gac aac cgg cgg gtg att gtc atg gag aag gga ccc ctt ccc	4135				
Glu Asp Asn Arg Arg Val Ile Val Met Glu Lys Gly Pro Leu Pro					
1260	1265	1270			
agc ccc act gca ggg ctg gag gag agc agt ggc cag gga cca agc	4180				
Ser Pro Thr Ala Gly Leu Glu Glu Ser Ser Gly Gln Gly Pro Ser					
1275	1280	1285			
tca ccg gtg gcc ctg ctg ggg cag gtt cag gac ttc cag cag tct	4225				
Ser Pro Val Ala Leu Leu Gly Gln Val Gln Asp Phe Gln Gln Ser					
1290	1295	1300			
gca gag tgc cag ccg aag gaa gag ggt tcc agg gac ccg gca gac	4270				
Ala Glu Cys Gln Pro Lys Glu Glu Gly Ser Arg Asp Pro Ala Asp					
1305	1310	1315			
ccg agc cag cag ggc aga gtg aga aac ctt aga gag aag ttc cag	4315				
Pro Ser Gln Gln Gly Arg Val Arg Asn Leu Arg Glu Lys Phe Gln					
1320	1325	1330			
gcc ttg aac tct gtc ggt tga tgctgactcc tgggggaggg aggagtcacg	4366				
Ala Leu Asn Ser Val Gly					
1335	1340				
ttggagggttg gggaagaacc tggggcaccct tcccccaag cctgggctca tggagccct	4426				
gcccagggcc ctcagggtggg cggaaagtcc atccccctccg cccttcagga aggatgctcc	4486				
cgtgtgcagg ggtctcctgc ctgtgccatc cactggggct cgagacaatt tcccactcac	4546				
ctgtgaggcc ggtgtggctg cttcccttgt aaatagttgt tctctggtaa gaagccaaat	4606				

```

atttaagctc acttcttccc agagagagga agctctgctc aggcctccag cgttggctgg      4666
ccatggccac agccagatgg aggagcccat ccccaggaga ctcaggcagt ggcctggaga      4726
ggctttgttc tgtaacggtg ccttttctta ggggtccaggc aggaatgaag ccaataattt      4786
attgctttcc attctgtggt atgatgtgcg tgtgcgtgag tgtgtggccc ctgtttattc      4846
ccctcctgtc aagaatgaag tggattcagt tcaggctactt ttgagggttg ttgtgctgac      4906
cctgtgggttg tcgctgatgt acacacattt cattatttgc caatggtgca ataaccactg      4966
ctgaccaacc c                                                                4977

```

```

<210> 2
<211> 1340
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 2

```

```

Met Pro Val Ser Thr Ser Leu His Gln Asp Gly Ser Gln Glu Arg Pro
1              5              10              15

```

```

Val Ser Leu Thr Ser Thr Thr Ser Ser Ser Gly Ser Ser Cys Asp Ser
          20              25              30

```

```

Arg Ser Ala Met Glu Glu Pro Ser Ser Ser Glu Ala Pro Ala Lys Asn
          35              40              45

```

```

Gly Ala Gly Ser Leu Arg Ser Arg His Leu Pro Asn Ser Asn Asn Asn
          50              55              60

```

```

Ser Ser Ser Trp Leu Asn Val Lys Gly Pro Leu Ser Pro Phe Asn Ser
65              70              75              80

```

```

Arg Ala Ala Ala Gly Pro Ala His His Lys Leu Ser Tyr Leu Gly Arg
          85              90              95

```

```

Val Val Arg Glu Ile Val Glu Thr Glu Arg Met Tyr Val Gln Asp Leu
          100              105              110

```


Arg Ser Ile Val Glu Asp Tyr Leu Leu Lys Ile Ile Asp Thr Pro Gly
115 120 125

Leu Leu Lys Pro Glu Gln Val Ser Ala Leu Phe Gly Asn Ile Glu Asn
130 135 140

Ile Tyr Ala Leu Asn Ser Gln Leu Leu Arg Asp Leu Asp Ser Cys Asn
145 150 155 160

Ser Asp Pro Val Ala Val Ala Ser Cys Phe Val Glu Arg Ser Gln Glu
165 170 175

Phe Asp Ile Tyr Thr Gln Tyr Cys Asn Asn Tyr Pro Asn Ser Val Ala
180 185 190

Ala Leu Thr Glu Cys Met Arg Asp Lys Gln Gln Ala Lys Phe Phe Arg
195 200 205

Asp Arg Gln Glu Leu Leu Gln His Ser Leu Pro Leu Gly Ser Tyr Leu
210 215 220

Leu Lys Pro Val Gln Arg Ile Leu Lys Tyr His Leu Leu Leu Gln Glu
225 230 235 240

Ile Ala Lys His Phe Asp Glu Glu Glu Asp Gly Phe Glu Val Val Glu
245 250 255

Asp Ala Ile Asp Thr Met Thr Cys Val Ala Trp Tyr Ile Asn Asp Met
260 265 270

Lys Arg Arg His Glu His Ala Val Arg Leu Gln Glu Ile Gln Ser Leu
275 280 285

Leu Ile Asn Trp Lys Gly Pro Asp Leu Thr Thr Tyr Gly Glu Leu Val
290 295 300

Leu Glu Gly Thr Phe Arg Val His Arg Val Arg Asn Glu Arg Thr Phe
305 310 315 320

Phe Leu Phe Asp Lys Thr Leu Leu Ile Thr Lys Lys Arg Gly Asp His
325 330 335

Phe Val Tyr Lys Gly Asn Ile Pro Cys Ser Ser Leu Met Leu Ile Glu
340 345 350

Ser Thr Arg Asp Ser Leu Cys Phe Thr Val Thr His Tyr Lys His Ser
355 360 365

Lys Gln Gln Tyr Ser Ile Gln Ala Lys Thr Val Glu Glu Lys Arg Asn
370 375 380

Trp Thr His His Ile Lys Arg Leu Ile Leu Glu Asn His His Ala Thr
385 390 395 400

Ile Pro Gln Lys Ala Lys Glu Ala Ile Leu Glu Met Asp Ser Tyr Tyr
405 410 415

Pro Asn Arg Tyr Arg Cys Ser Pro Glu Arg Leu Lys Lys Ala Trp Ser
420 425 430

Ser Gln Asp Glu Val Ser Thr Asn Val Arg Gln Gly Arg Arg Gln Ser
435 440 445

Glu Pro Thr Lys His Leu Leu Arg Gln Leu Asn Glu Lys Ala Arg Ala
450 455 460

Ala Gly Met Lys His Ala Gly Ser Ala Gly Thr Leu Leu Asp Phe Gly
465 470 475 480

Gln Pro Ser Arg Thr Arg Gly Leu Gln Pro Glu Ala Glu Gly Ala Thr
485 490 495

Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Val Glu Glu Glu Glu Glu
500 505 510

Glu Glu Glu Glu Glu Gln Ala Phe Gln Val Ser Leu Glu Asp Leu Thr
515 520 525

Gly His Glu Gly Asn Glu Lys Gly Ala Gly Pro Glu Pro Pro Gly Ser
530 535 540

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gln Glu Glu Ser Leu Ala Val Ala Glu Gln
545 550 555 560

Val Ala Asp Phe Ala Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu His Cys Trp His
565 570 575

Tyr Arg Ala Asn Ala Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ala Met Gly Lys Gly
580 585 590

Arg Arg Glu Ser Glu Ser Ser Arg Ser Ser Arg Arg Pro Ser Gly Arg
595 600 605

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Lys Arg Met Ser Phe Glu Ser Ile Ser Ser
610 615 620

Leu Pro Glu Val Glu Pro Asp Pro Glu Ala Gly Ser Glu Gln Glu Val
625 630 635 640

Phe Ser Ala Val Glu Gly Pro Ser Ala Glu Glu Thr Pro Ser Asp Thr
645 650 655

Glu Ser Pro Glu Val Leu Glu Thr Gln Leu Asp Ala His Gln Gly Leu
660 665 670

Leu Gly Met Asp Pro Pro Gly Asp Met Val Asp Phe Val Ala Ala Glu
675 680 685

Ser Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Ser Glu Glu Glu Glu Glu Met
690 695 700

Gly Gly Ala Ala Gln Glu Pro Glu Ser Leu Leu Pro Pro Ser Val Leu
705 710 715 720

Asp	Gln	Ala	Ser	Val	Ile	Ala	Glu	Arg	Phe	Val	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	725	730	735	
Arg	Ser	Ser	Val	Ala	Gln	Glu	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Gly	Phe	Gly	Ser	740	745	750	
Pro	Arg	Leu	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Glu	Gly	Ser	755	760	765	
Glu	Lys	Gly	Leu	Ala	Arg	His	Gly	Ser	Ala	Thr	Asp	Ser	Leu	Ser	Cys	770	775	780	
Gln	Leu	Ser	Pro	Glu	Val	Asp	Ile	Ser	Val	Gly	Val	Ala	Thr	Glu	Asp	785	790	795	800
Ser	Pro	Ser	Val	Asn	Gly	Met	Glu	Pro	Pro	Ser	Pro	Gly	Cys	Pro	Val	805	810	815	
Glu	Pro	Asp	Arg	Ser	Ser	Cys	Lys	Lys	Lys	Glu	Ser	Ala	Leu	Ser	Thr	820	825	830	
Arg	Asp	Arg	Leu	Leu	Leu	Asp	Lys	Ile	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Ala	835	840	845	
Glu	His	His	Asp	Ala	Gly	Phe	Ser	Val	Arg	Arg	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	850	855	860	
Tyr	Ile	Pro	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Asn	Ser	Ile	Ser	Arg	Phe	Asn	Ser	865	870	875	880
Leu	Pro	Arg	Pro	Asp	Pro	Glu	Pro	Val	Pro	Pro	Val	Gly	Ser	Lys	Arg	885	890	895	
Gln	Val	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Ser	Trp	Ala	Leu	Phe	Glu	Leu	Pro	Gly	900	905	910	

Pro Ser Gln Ala Val Lys Gly Asp Pro Pro Pro Ile Ser Asp Ala Glu
915 920 925

Phe Arg Pro Ser Ser Glu Ile Val Lys Ile Trp Glu Gly Met Glu Ser
930 935 940

Ser Gly Gly Ser Pro Gly Lys Gly Pro Gly Gln Gly Gln Ala Asn Gly
945 950 955 960

Phe Asp Leu His Glu Pro Leu Phe Ile Leu Glu Glu His Glu Leu Gly
965 970 975

Ala Ile Thr Glu Glu Ser Ala Thr Ala Ser Pro Glu Ser Ser Ser Pro
980 985 990

Thr Glu Gly Arg Ser Pro Ala His Leu Ala Arg Glu Leu Lys Glu Leu
995 1000 1005

Val Lys Glu Leu Ser Ser Ser Thr Gln Gly Glu Leu Val Ala Pro
1010 1015 1020

Leu His Pro Arg Ile Val Gln Leu Ser His Val Met Asp Ser His
1025 1030 1035

Val Ser Glu Arg Val Lys Asn Lys Val Tyr Gln Leu Ala Arg Gln
1040 1045 1050

Tyr Ser Leu Arg Ile Lys Ser Asn Lys Pro Val Met Ala Arg Pro
1055 1060 1065

Pro Leu Gln Trp Glu Lys Val Ala Pro Glu Arg Asp Gly Lys Ser
1070 1075 1080

Pro Thr Val Pro Cys Leu Gln Glu Glu Ala Gly Glu Pro Leu Gly
1085 1090 1095

Gly Lys Gly Lys Arg Lys Pro Val Leu Ser Leu Phe Asp Tyr Glu
1100 1105 1110

Gln	Leu	Met	Ala	Gln	Glu	His	Ser	Pro	Pro	Lys	Pro	Ser	Ser	Ala
1115						1120					1125			
Gly	Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Pro	Ser	Ala	Val
1130						1135					1140			
Ser	Gln	Arg	Thr	Thr	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	Ala	Trp	Ser
1145						1150					1155			
Pro	Leu	Ser	Pro	Thr	Glu	Thr	Phe	Ser	Trp	Pro	Asp	Val	Arg	Glu
1160						1165					1170			
Leu	Cys	Ser	Lys	Tyr	Ala	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Arg	Arg	Ala	Gly
1175						1180					1185			
Gly	Gly	Arg	Pro	Arg	Gly	Pro	Pro	Val	Asn	Arg	Ser	His	Ser	Val
1190						1195					1200			
Pro	Glu	Asn	Met	Val	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gly	Arg	Val	Gly	Arg
1205						1210					1215			
Cys	Arg	Ser	Leu	Ser	Thr	Lys	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala
1220						1225					1230			
Ala	Gln	Ser	Pro	Gly	Pro	Leu	Pro	Gln	Ser	Lys	Pro	Asp	Gly	Gly
1235						1240					1245			
Glu	Thr	Leu	Tyr	Val	Thr	Ala	Asp	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Asn	Arg
1250						1255					1260			
Arg	Val	Ile	Val	Met	Glu	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Pro	Thr	Ala
1265						1270					1275			
Gly	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Pro	Val	Ala
1280						1285					1290			

Leu	Leu	Gly	Gln	Val	Gln	Asp	Phe	Gln	Gln	Ser	Ala	Glu	Cys	Gln
1295						1300					1305			

Pro	Lys	Glu	Glu	Gly	Ser	Arg	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro	Ser	Gln	Gln
1310						1315					1320			

Gly	Arg	Val	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Lys	Phe	Gln	Ala	Leu	Asn	Ser
1325						1330					1335			

Val	Gly
1340	

<210> 3
 <211> 1095
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1095)
 <223>

<220>
 <221> misc-feature
 <223> A partial sequence of SEQ ID NO:1 consisting of the nucleotides from the 581st to the 1675th, which comprises a region coding for Dbl homology domain and Pleckstrin homology domain

<400> 3

aag	ctc	agc	tac	ctg	ggc	cga	gtg	gtg	cgg	gag	atc	gtg	gag	aca	gag	48
Lys	Leu	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Val	Val	Arg	Glu	Ile	Val	Glu	Thr	Glu	
1				5					10					15		

cgc	atg	tac	gta	cag	gac	ctg	cgc	agc	atc	gtg	gag	gac	tac	ctc	ttg	96
Arg	Met	Tyr	Val	Gln	Asp	Leu	Arg	Ser	Ile	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Leu	
			20					25					30			

aag	atc	att	gac	aca	ccc	ggg	ctg	ctg	aag	cca	gaa	cag	gtc	agc	gcc	144
Lys	Ile	Ile	Asp	Thr	Pro	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Glu	Gln	Val	Ser	Ala	
		35					40					45				

ctc	ttt	ggg	aac	ata	gaa	aac	atc	tac	gcg	ctg	aac	agc	cag	ctc	ctc	192
Leu	Phe	Gly	Asn	Ile	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ala	Leu	Asn	Ser	Gln	Leu	Leu	
	50					55					60					

aga gac ctg gac agc tgc aat agt gac ccc gtg gct gtg gcc agc tgc	240
Arg Asp Leu Asp Ser Cys Asn Ser Asp Pro Val Ala Val Ala Ser Cys	
65 70 75 80	
ttt gtg gaa agg agc caa gag ttt gat atc tac act cag tat tgc aac	288
Phe Val Glu Arg Ser Gln Glu Phe Asp Ile Tyr Thr Gln Tyr Cys Asn	
85 90 95	
aat tac ccc aac tcc gtg gcc gcc ctg acg gaa tgc atg cgg gac aag	336
Asn Tyr Pro Asn Ser Val Ala Ala Leu Thr Glu Cys Met Arg Asp Lys	
100 105 110	
cag cag gcc aag ttc ttt cgg gac cgg cag gag ctg cta cag cac tcg	384
Gln Gln Ala Lys Phe Phe Arg Asp Arg Gln Glu Leu Leu Gln His Ser	
115 120 125	
ctg ccc ttg ggc tcc tac ctg ctg aag cca gtc cag cgc atc ctc aag	432
Leu Pro Leu Gly Ser Tyr Leu Leu Lys Pro Val Gln Arg Ile Leu Lys	
130 135 140	
tac cac ctg ctg ctc cag gaa att gcc aaa cat ttt gat gaa gaa gag	480
Tyr His Leu Leu Leu Gln Glu Ile Ala Lys His Phe Asp Glu Glu Glu	
145 150 155 160	
gat ggc ttt gag gtg gtg gag gat gcc att gac acc atg acc tgt gtg	528
Asp Gly Phe Glu Val Val Glu Asp Ala Ile Asp Thr Met Thr Cys Val	
165 170 175	
gcc tgg tac atc aac gac atg aag agg agg cat gag cac gcg gtc cgg	576
Ala Trp Tyr Ile Asn Asp Met Lys Arg Arg His Glu His Ala Val Arg	
180 185 190	
ctc cag gag att cag tca ctc ctc atc aac tgg aag ggg ccc gac ctg	624
Leu Gln Glu Ile Gln Ser Leu Leu Ile Asn Trp Lys Gly Pro Asp Leu	
195 200 205	
acc acc tac ggg gag ctt gtc ctg gag ggc aca ttc cgc gtg cat cgc	672
Thr Thr Tyr Gly Glu Leu Val Leu Glu Gly Thr Phe Arg Val His Arg	
210 215 220	
gtg cgc aat gaa agg acc ttt ttc ctc ttt gac aaa aca ctg ctt atc	720
Val Arg Asn Glu Arg Thr Phe Phe Leu Phe Asp Lys Thr Leu Leu Ile	
225 230 235 240	
acc aag aag cgg ggc gat cac ttt gtc tac aag ggc aac atc ccg tgc	768
Thr Lys Lys Arg Gly Asp His Phe Val Tyr Lys Gly Asn Ile Pro Cys	
245 250 255	
tcc tcc ctg atg ctg atc gaa agc acc aga gac tcc ctg tgc ttc act	816
Ser Ser Leu Met Leu Ile Glu Ser Thr Arg Asp Ser Leu Cys Phe Thr	

260								265				270				
gtc	acc	cac	tac	aag	cac	agc	aag	cag	cag	tac	agc	atc	cag	gcc	aag	864
Val	Thr	His	Tyr	Lys	His	Ser	Lys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Lys	
		275					280					285				
aca	gtg	gag	gag	aaa	cgg	aac	tgg	act	cac	cac	atc	aag	agg	ctc	atc	912
Thr	Val	Glu	Glu	Lys	Arg	Asn	Trp	Thr	His	His	Ile	Lys	Arg	Leu	Ile	
	290					295					300					
cta	gag	aac	cac	cat	gcc	acc	att	ccc	cag	aag	gcc	aag	gaa	gcc	atc	960
Leu	Glu	Asn	His	His	Ala	Thr	Ile	Pro	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Ala	Ile	
305					310					315					320	
ttg	gaa	atg	gat	tcc	tat	tat	ccc	aat	cgg	tac	cgc	tgc	agc	cca	gag	1008
Leu	Glu	Met	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Arg	Tyr	Arg	Cys	Ser	Pro	Glu	
				325					330					335		
cgg	ctg	aag	aag	gct	tgg	tcc	tcc	cag	gat	gag	gtg	tcc	acc	aat	gtg	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Ala	Trp	Ser	Ser	Gln	Asp	Glu	Val	Ser	Thr	Asn	Val	
			340					345					350			
cgc	cag	ggg	cgc	cgg	caa	tct	gag	cca	acc	aaa	cac	ctg				1095
Arg	Gln	Gly	Arg	Arg	Gln	Ser	Glu	Pro	Thr	Lys	His	Leu				
		355					360					365				

<210> 4
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Lys	Leu	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Val	Val	Arg	Glu	Ile	Val	Glu	Thr	Glu	
1				5					10					15		
Arg	Met	Tyr	Val	Gln	Asp	Leu	Arg	Ser	Ile	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Leu	
			20					25					30			
Lys	Ile	Ile	Asp	Thr	Pro	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Glu	Gln	Val	Ser	Ala	
		35					40					45				
Leu	Phe	Gly	Asn	Ile	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ala	Leu	Asn	Ser	Gln	Leu	Leu	
	50						55				60					

Arg Asp Leu Asp Ser Cys Asn Ser Asp Pro Val Ala Val Ala Ser Cys
65 70 75 80

Phe Val Glu Arg Ser Gln Glu Phe Asp Ile Tyr Thr Gln Tyr Cys Asn
85 90 95

Asn Tyr Pro Asn Ser Val Ala Ala Leu Thr Glu Cys Met Arg Asp Lys
100 105 110

Gln Gln Ala Lys Phe Phe Arg Asp Arg Gln Glu Leu Leu Gln His Ser
115 120 125

Leu Pro Leu Gly Ser Tyr Leu Leu Lys Pro Val Gln Arg Ile Leu Lys
130 135 140

Tyr His Leu Leu Leu Gln Glu Ile Ala Lys His Phe Asp Glu Glu Glu
145 150 155 160

Asp Gly Phe Glu Val Val Glu Asp Ala Ile Asp Thr Met Thr Cys Val
165 170 175

Ala Trp Tyr Ile Asn Asp Met Lys Arg Arg His Glu His Ala Val Arg
180 185 190

Leu Gln Glu Ile Gln Ser Leu Leu Ile Asn Trp Lys Gly Pro Asp Leu
195 200 205

Thr Thr Tyr Gly Glu Leu Val Leu Glu Gly Thr Phe Arg Val His Arg
210 215 220

Val Arg Asn Glu Arg Thr Phe Phe Leu Phe Asp Lys Thr Leu Leu Ile
225 230 235 240

Thr Lys Lys Arg Gly Asp His Phe Val Tyr Lys Gly Asn Ile Pro Cys
245 250 255

Ser Ser Leu Met Leu Ile Glu Ser Thr Arg Asp Ser Leu Cys Phe Thr
260 265 270

Val Thr His Tyr Lys His Ser Lys Gln Gln Tyr Ser Ile Gln Ala Lys
 275 280 285

Thr Val Glu Glu Lys Arg Asn Trp Thr His His Ile Lys Arg Leu Ile
 290 295 300

Leu Glu Asn His His Ala Thr Ile Pro Gln Lys Ala Lys Glu Ala Ile
 305 310 315 320

Leu Glu Met Asp Ser Tyr Tyr Pro Asn Arg Tyr Arg Cys Ser Pro Glu
 325 330 335

Arg Leu Lys Lys Ala Trp Ser Ser Gln Asp Glu Val Ser Thr Asn Val
 340 345 350

Arg Gln Gly Arg Arg Gln Ser Glu Pro Thr Lys His Leu
 355 360 365

<210> 5
 <211> 1102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (5)..(1102)
 <223>

<220>
 <221> misc-feature
 <223> A polynucleotide that comprises a kozak consensus sequence and a
 sequence coding for methionine in its 5'-terminal, followed by a
 partial sequence of SEQ ID NO:1 consisting of the nucleotides fro
 m the 581st to the 1675th, which comprises a region coding for Db
 1 homology domain and Pleckstrin homology domain

<400> 5
 cacc atg aag ctc agc tac ctg ggc cga gtg gtg cgg gag atc gtg gag 49
 Met Lys Leu Ser Tyr Leu Gly Arg Val Val Arg Glu Ile Val Glu
 1 5 10 15

aca	gag	cgc	atg	tac	gta	cag	gac	ctg	cgc	agg	atc	gtg	gag	gac	tac	97
Thr	Glu	Arg	Met	Tyr	Val	Gln	Asp	Leu	Arg	Ser	Ile	Val	Glu	Asp	Tyr	
			20					25						30		
ctc	ttg	aag	atc	att	gac	aca	ccc	ggg	ctg	ctg	aag	cca	gaa	cag	gtc	145
Leu	Leu	Lys	Ile	Ile	Asp	Thr	Pro	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Glu	Gln	Val	
		35						40					45			
agg	gcc	ctc	ttt	ggg	aac	ata	gaa	aac	atc	tac	gcg	ctg	aac	agg	cag	193
Ser	Ala	Leu	Phe	Gly	Asn	Ile	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ala	Leu	Asn	Ser	Gln	
		50					55					60				
ctc	ctc	aga	gac	ctg	gac	agg	tgc	aat	agt	gac	ccc	gtg	gct	gtg	gcc	241
Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Asp	Ser	Cys	Asn	Ser	Asp	Pro	Val	Ala	Val	Ala	
	65					70					75					
agg	tgc	ttt	gtg	gaa	agg	agg	caa	gag	ttt	gat	atc	tac	act	cag	tat	289
Ser	Cys	Phe	Val	Glu	Arg	Ser	Gln	Glu	Phe	Asp	Ile	Tyr	Thr	Gln	Tyr	
80					85					90					95	
tgc	aac	aat	tac	ccc	aac	tcc	gtg	gcc	gcc	ctg	acg	gaa	tgc	atg	cgg	337
Cys	Asn	Asn	Tyr	Pro	Asn	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Thr	Glu	Cys	Met	Arg	
				100					105					110		
gac	aag	cag	cag	gcc	aag	ttc	ttt	cgg	gac	cgg	cag	gag	ctg	cta	cag	385
Asp	Lys	Gln	Gln	Ala	Lys	Phe	Phe	Arg	Asp	Arg	Gln	Glu	Leu	Leu	Gln	
			115					120					125			
cac	tcg	ctg	ccc	ttg	ggc	tcc	tac	ctg	ctg	aag	cca	gtc	cag	cgc	atc	433
His	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	Tyr	Leu	Leu	Lys	Pro	Val	Gln	Arg	Ile	
		130					135					140				
ctc	aag	tac	cac	ctg	ctg	ctc	cag	gaa	att	gcc	aaa	cat	ttt	gat	gaa	481
Leu	Lys	Tyr	His	Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Ile	Ala	Lys	His	Phe	Asp	Glu	
	145					150				155						
gaa	gag	gat	ggc	ttt	gag	gtg	gtg	gag	gat	gcc	att	gac	acc	atg	acc	529
Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Glu	Val	Val	Glu	Asp	Ala	Ile	Asp	Thr	Met	Thr	
160					165					170					175	
tgt	gtg	gcc	tgg	tac	atc	aac	gac	atg	aag	agg	agg	cat	gag	cac	gcg	577
Cys	Val	Ala	Trp	Tyr	Ile	Asn	Asp	Met	Lys	Arg	Arg	His	Glu	His	Ala	
				180					185					190		
gtc	cgg	ctc	cag	gag	att	cag	tca	ctc	ctc	atc	aac	tgg	aag	ggg	ccc	625
Val	Arg	Leu	Gln	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Leu	Ile	Asn	Trp	Lys	Gly	Pro	
			195					200					205			
gac	ctg	acc	acc	tac	ggg	gag	ctt	gtc	ctg	gag	ggc	aca	ttc	cgc	gtg	673
Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	Gly	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	Val	

210

215

220

cat	cgc	gtg	cgc	aat	gaa	agg	acc	ttt	ttc	ctc	ttt	gac	aaa	aca	ctg	721
His	Arg	Val	Arg	Asn	Glu	Arg	Thr	Phe	Phe	Leu	Phe	Asp	Lys	Thr	Leu	
	225					230					235					

ctt	atc	acc	aag	aag	cgg	ggc	gat	cac	ttt	gtc	tac	aag	ggc	aac	atc	769
Leu	Ile	Thr	Lys	Lys	Arg	Gly	Asp	His	Phe	Val	Tyr	Lys	Gly	Asn	Ile	
240					245					250					255	

cgc	tgc	tcc	tcc	ctg	atg	ctg	atc	gaa	agc	acc	aga	gac	tcc	ctg	tgc	817
Pro	Cys	Ser	Ser	Leu	Met	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	Arg	Asp	Ser	Leu	Cys	
				260					265					270		

ttc	act	gtc	acc	cac	tac	aag	cac	agc	aag	cag	cag	tac	agc	atc	cag	865
Phe	Thr	Val	Thr	His	Tyr	Lys	His	Ser	Lys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Ile	Gln	
			275					280					285			

gcc	aag	aca	gtg	gag	gag	aaa	cgg	aac	tgg	act	cac	cac	atc	aag	agg	913
Ala	Lys	Thr	Val	Glu	Glu	Lys	Arg	Asn	Trp	Thr	His	His	Ile	Lys	Arg	
		290					295					300				

ctc	atc	cta	gag	aac	cac	cat	gcc	acc	att	ccc	cag	aag	gcc	aag	gaa	961
Leu	Ile	Leu	Glu	Asn	His	His	Ala	Thr	Ile	Pro	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	
	305					310					315					

gcc	atc	ttg	gaa	atg	gat	tcc	tat	tat	ccc	aat	cgg	tac	cgc	tgc	agc	1009
Ala	Ile	Leu	Glu	Met	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Arg	Tyr	Arg	Cys	Ser	
320					325					330					335	

cca	gag	cgg	ctg	aag	aag	gct	tgg	tcc	tcc	cag	gat	gag	gtg	tcc	acc	1057
Pro	Glu	Arg	Leu	Lys	Lys	Ala	Trp	Ser	Ser	Gln	Asp	Glu	Val	Ser	Thr	
				340					345					350		

aat	gtg	cgc	cag	ggg	cgc	cgg	caa	tct	gag	cca	acc	aaa	cac	ctg		1102
Asn	Val	Arg	Gln	Gly	Arg	Arg	Gln	Ser	Glu	Pro	Thr	Lys	His	Leu		
			355					360					365			

<210> 6
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met	Lys	Leu	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Val	Val	Arg	Glu	Ile	Val	Glu	Thr
1				5					10					15	

Glu Arg Met Tyr Val Gln Asp Leu Arg Ser Ile Val Glu Asp Tyr Leu
20 25 30

Leu Lys Ile Ile Asp Thr Pro Gly Leu Leu Lys Pro Glu Gln Val Ser
35 40 45

Ala Leu Phe Gly Asn Ile Glu Asn Ile Tyr Ala Leu Asn Ser Gln Leu
50 55 60

Leu Arg Asp Leu Asp Ser Cys Asn Ser Asp Pro Val Ala Val Ala Ser
65 70 75 80

Cys Phe Val Glu Arg Ser Gln Glu Phe Asp Ile Tyr Thr Gln Tyr Cys
85 90 95

Asn Asn Tyr Pro Asn Ser Val Ala Ala Leu Thr Glu Cys Met Arg Asp
100 105 110

Lys Gln Gln Ala Lys Phe Phe Arg Asp Arg Gln Glu Leu Leu Gln His
115 120 125

Ser Leu Pro Leu Gly Ser Tyr Leu Leu Lys Pro Val Gln Arg Ile Leu
130 135 140

Lys Tyr His Leu Leu Leu Gln Glu Ile Ala Lys His Phe Asp Glu Glu
145 150 155 160

Glu Asp Gly Phe Glu Val Val Glu Asp Ala Ile Asp Thr Met Thr Cys
165 170 175

Val Ala Trp Tyr Ile Asn Asp Met Lys Arg Arg His Glu His Ala Val
180 185 190

Arg Leu Gln Glu Ile Gln Ser Leu Leu Ile Asn Trp Lys Gly Pro Asp
195 200 205

Leu Thr Thr Tyr Gly Glu Leu Val Leu Glu Gly Thr Phe Arg Val His
210 215 220

Arg Val Arg Asn Glu Arg Thr Phe Phe Leu Phe Asp Lys Thr Leu Leu
225 230 235 240

Ile Thr Lys Lys Arg Gly Asp His Phe Val Tyr Lys Gly Asn Ile Pro
245 250 255

Cys Ser Ser Leu Met Leu Ile Glu Ser Thr Arg Asp Ser Leu Cys Phe
260 265 270

Thr Val Thr His Tyr Lys His Ser Lys Gln Gln Tyr Ser Ile Gln Ala
275 280 285

Lys Thr Val Glu Glu Lys Arg Asn Trp Thr His His Ile Lys Arg Leu
290 295 300

Ile Leu Glu Asn His His Ala Thr Ile Pro Gln Lys Ala Lys Glu Ala
305 310 315 320

Ile Leu Glu Met Asp Ser Tyr Tyr Pro Asn Arg Tyr Arg Cys Ser Pro
325 330 335

Glu Arg Leu Lys Lys Ala Trp Ser Ser Gln Asp Glu Val Ser Thr Asn
340 345 350

Val Arg Gln Gly Arg Arg Gln Ser Glu Pro Thr Lys His Leu
355 360 365

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:1 for
use as a primer

<400> 7
gggagatgtc accacagcgt tt

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:1 for
use as a primer

<400> 8
aatggatccc gaccgacaga gttcaaggc 29

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:1 for
use as a primer

<400> 9
caccatgaag ctcagctacc tgggccgagt ggtg 34

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of SEQ ID NO:1 for
use as a primer

<400> 10
cagggtgtttg gttggctcag attgcc 26

<210> 11
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of proto-Dbl for us
e as a primer

<400> 11

aatagatctg gaaatggcag ttttaaagaa ccacg 35

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of proto-Dbl for use as a primer

<400> 12
aatgtcgacc tgcttcaaca aaatatattc 29

<210> 13
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of Cdc42 for use as a primer

<400> 13
caccatgcag acaattaagt gtgttggttg 29

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of Cdc42 for use as a primer

<400> 14
tcatagcagc acacacctgc ggctc 25

<210> 15
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of RhoA for use as a primer

<400> 15
caccatggct gccatccgga agaaactgg 29

<210> 16
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of RhoA for use as
a primer

<400> 16
tcacaagaca aggcaaccag attttttc 28

<210> 17
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of Rac1 for use as
a primer

<400> 17
caccatgcag gccatcaagt gtgtgggtgg 29

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide based on the sequence of Rac1 for use as
a primer

<400> 18
ttacaacagc aggcattttc tcttcc 26

<210> 19
<211> 7
<212> DNA
<213> artificial

<220>

<223> Designed oligonucleotide including Kozak consensus sequence followed by a codon corresponding to Methionine

<400> 19
caccatg

7

<210> 20
<211> 576
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 20
atgcagacaa ttaagtgtgt tgttgtgggc gatggtgctg ttggtaaaac atgtctcctg 60
atatcctaca caacaaacaa atttccatcg gaatatgtac cgactgtttt tgacaactat 120
gcagtcacag ttatgattgg tggagaacca tatactcttg gactttttga tactgcaggg 180
caagaggatt atgacagatt acgaccgctg agttatccac aaacagatgt atttctagtc 240
tgtttttcag tggctctctcc atcttcattt gaaaacgtga aagaaaagtg ggtgcctgag 300
ataactcacc actgtccaaa gactcctttc ttgcttgttg ggactcaa at tgatctcaga 360
gatgaccct ctactattga gaaacttgcc aagaacaaac agaagcctat cactccagag 420
actgctgaaa agctggcccg tgacctgaag gctgtcaagt atgtggagtg ttctgcactt 480
acacagaaaag gcctaaagaa tgtatttgac gaagcaatat tggetgccct ggagcctcca 540
gaaccgaaga agagccgcag gtgtgtgctg ctatga 576

<210> 21
<211> 191
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 21

Met Gln Thr Ile Lys Cys Val Val Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys
1 5 10 15

Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Phe Pro Ser Glu Tyr
20 25 30

Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Tyr Ala Val Thr Val Met Ile Gly Gly

35

40

45

Glu Pro Tyr Thr Leu Gly Leu Phe Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr
 50 55 60

Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Gln Thr Asp Val Phe Leu Val
 65 70 75 80

Cys Phe Ser Val Val Ser Pro Ser Ser Phe Glu Asn Val Lys Glu Lys
 85 90 95

Trp Val Pro Glu Ile Thr His His Cys Pro Lys Thr Pro Phe Leu Leu
 100 105 110

Val Gly Thr Gln Ile Asp Leu Arg Asp Asp Pro Ser Thr Ile Glu Lys
 115 120 125

Leu Ala Lys Asn Lys Gln Lys Pro Ile Thr Pro Glu Thr Ala Glu Lys
 130 135 140

Leu Ala Arg Asp Leu Lys Ala Val Lys Tyr Val Glu Cys Ser Ala Leu
 145 150 155 160

Thr Gln Lys Gly Leu Lys Asn Val Phe Asp Glu Ala Ile Leu Ala Ala
 165 170 175

Leu Glu Pro Pro Glu Pro Lys Lys Ser Arg Arg Cys Val Leu Leu
 180 185 190

<210> 22
 <211> 582
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 22
 atggctgcc a tccggaagaa actggtgatt gttggtgatg gagcctgtgg aaagacatgc 60
 ttgctcatag tcttcagcaa ggaccagttc ccagagggtgt atgtgccac agtgtttgag 120
 aactatgtgg cagatatcga ggtggatgga aagcaggtag agttggcttt gtgggacaca 180

gctgggcagg aagattatga tcgcctgagg cccctctcct acccagatac cgatgttata 240
ctgatgtgtt tttccatcga cagccctgat agtttagaaa acatcccaga aaagtggacc 300
ccagaagtca agcatttctg tcccaacgtg cccatcatcc tggttgggaa taagaaggat 360
cttcggaatg atgagcacac aaggcgggag ctageccaaga tgaagcagga gccggtgaaa 420
cctgaagaag gcagagatat ggcaaacagg attggcgctt ttgggtacat ggagtgttca 480
gcaaagacca aagatggagt gagagagggt tttgaaatgg ctacgagagc tgctctgcaa 540
gctagacgtg ggaagaaaaa atctggttgc cttgtcttgt ga 582

<210> 23

<211> 193

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys
1 5 10 15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu
20 25 30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
35 40 45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65 70 75 80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
85 90 95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
100 105 110

Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Lys	Asp	Leu	Arg	Asn	Asp	Glu	His	Thr	Arg
	115						120					125			

Arg	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Lys	Gln	Glu	Pro	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Gly
	130					135					140				

Arg	Asp	Met	Ala	Asn	Arg	Ile	Gly	Ala	Phe	Gly	Tyr	Met	Glu	Cys	Ser
145					150					155					160

Ala	Lys	Thr	Lys	Asp	Gly	Val	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Met	Ala	Thr	Arg
				165					170					175	

Ala	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Gly	Lys	Lys	Lys	Ser	Gly	Cys	Leu	Val
		180						185					190		

Leu

<210> 24
 <211> 579
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 24	
atgcaggcca tcaagtgtgt ggtgggtggga gacggagctg taggtaaaac ttgcctactg	60
atcagttaca caaccaatgc atttcctgga gaatatatcc ctactgtctt tgacaattat	120
tctgccaatg ttatggtaga tggaaaaccg gtgaatctgg gcttatggga tacagctgga	180
caagaagatt atgacagatt acgcccccta tcctatccgc aaacagatgt gttcttaatt	240
tgtttttccc ttgtgagtec tgcattcat t gaaaatgtcc gtgcaaagtg gtatcctgag	300
gtgcggcacc actgtcccaa cactcccatc atcctagtgg gaactaaact tgatcttagg	360
gatgataaag acacgatega gaaactgaag gagaagaagc tgactcccat cacctatccg	420
cagggtctag ccatggctaa ggagattggg gctgtaaaat acctggagtg ctcggcgctc	480
acacagcgag gcctcaagac agtgtttgac gaagcgatcc gagcagtcct ctgcccgcct	540
cccgtgaaga agaggaagag aaaatgcctg ctgtttgtaa	579

<210> 25
<211> 192
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 25

Met Gln Ala Ile Lys Cys Val Val Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys
1 5 10 15

Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Thr Asn Ala Phe Pro Gly Glu Tyr
20 25 30

Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Tyr Ser Ala Asn Val Met Val Asp Gly
35 40 45

Lys Pro Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr
50 55 60

Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Gln Thr Asp Val Phe Leu Ile
65 70 75 80

Cys Phe Ser Leu Val Ser Pro Ala Ser Phe Glu Asn Val Arg Ala Lys
85 90 95

Trp Tyr Pro Glu Val Arg His His Cys Pro Asn Thr Pro Ile Ile Leu
100 105 110

Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Asp Thr Ile Glu Lys
115 120 125

Leu Lys Glu Lys Lys Leu Thr Pro Ile Thr Tyr Pro Gln Gly Leu Ala
130 135 140

Met Ala Lys Glu Ile Gly Ala Val Lys Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Leu
145 150 155 160

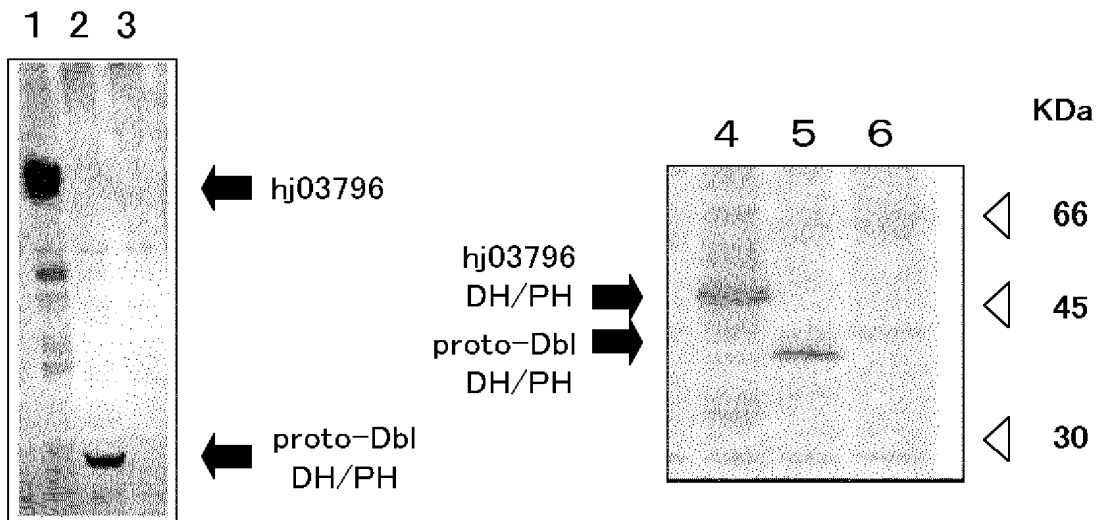
Thr Gln Arg Gly Leu Lys Thr Val Phe Asp Glu Ala Ile Arg Ala Val

165

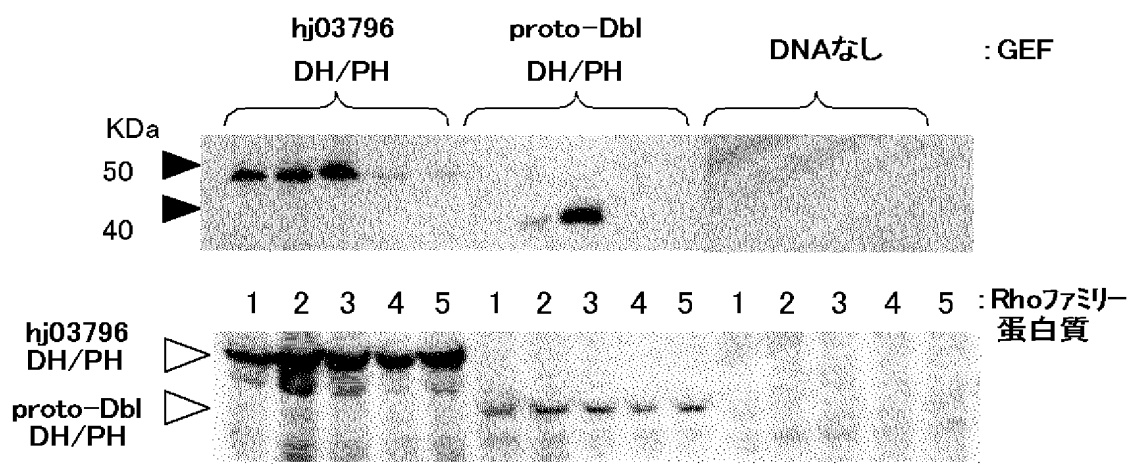
170

175

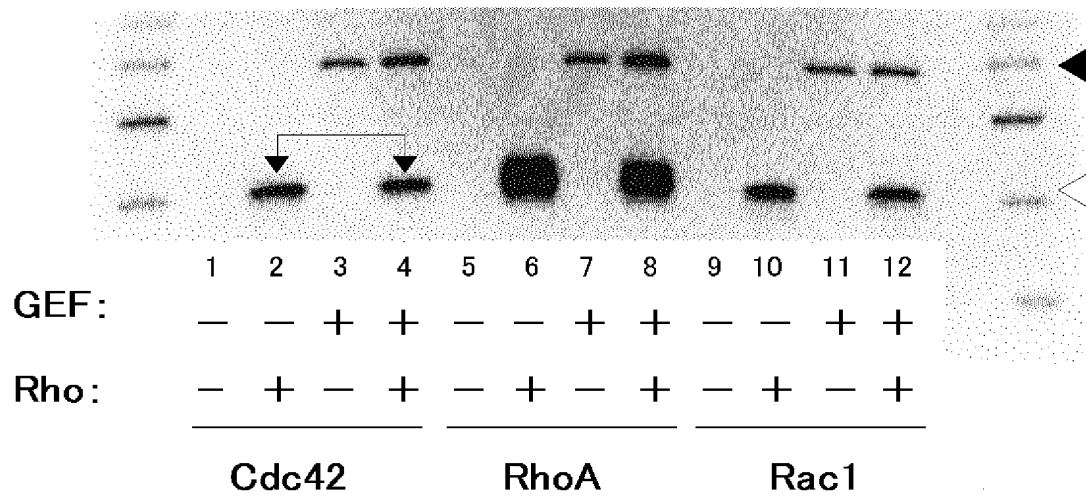
Leu Cys Pro Pro Pro Val Lys Lys Arg Lys Arg Lys Cys Leu Leu Leu
180 185 190



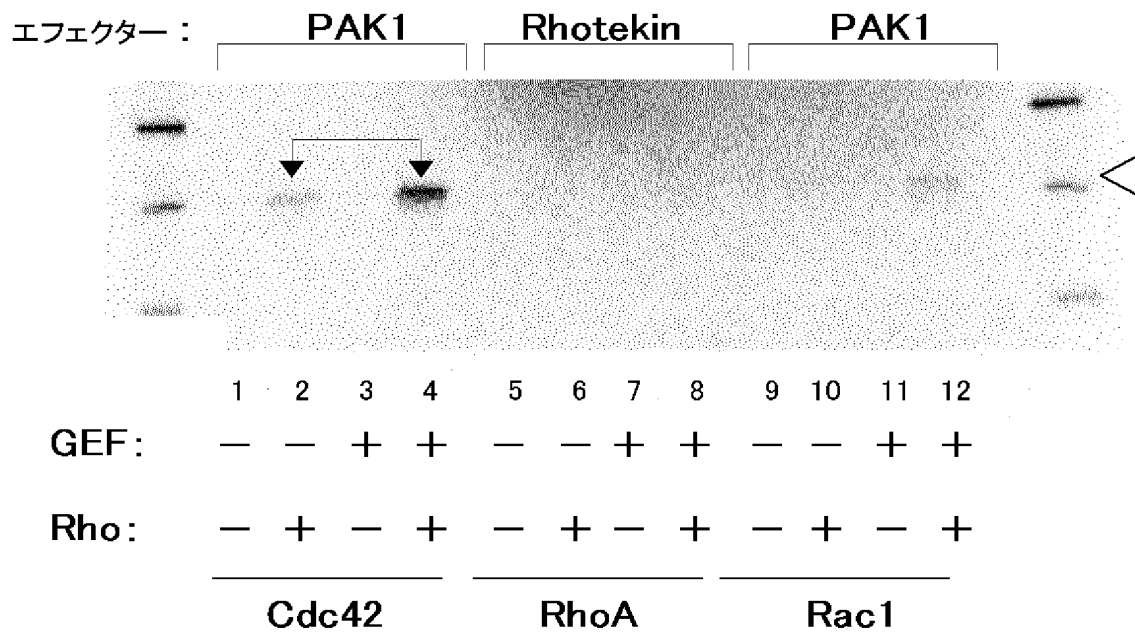
【図 2】



【図 3 - A】



【図 3 - B】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 低分子量GTP結合蛋白質の1グループであるRhoファミリー蛋白質に対してグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）として作用する新規な蛋白質および該蛋白質をコードする遺伝子を見出し、該GEFの機能および／または発現を阻害する化合物の同定方法、該GEFの機能および／または発現の異常に基づく疾患に用い得る医薬組成物、並びにその疾患の判定方法および試薬キットを提供すること。

【解決手段】 配列番号1、3または5に記載の塩基配列で表わされるポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドの相同物、前記ポリヌクレオチドがコードする蛋白質、前記ポリヌクレオチドを含むベクター、前記ベクターを含む形質転換体、前記蛋白質に対する抗体、これらを使用することを特徴とする前記蛋白質の機能および／または発現を阻害する化合物の同定方法並びに疾患の判定方法、これらを含んでなる医薬組成物および試薬キット。

出願人履歴

0 0 0 0 0 2 8 3 1

19900828

新規登録

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

第一製薬株式会社

5 9 9 1 1 3 9 1 4

19991015

名称変更

千葉県木更津市矢那1532番3号

財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所

5 9 9 1 1 3 9 1 4

20050324

住所変更

千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7

財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所